

Artigo original

Efeito da própolis na prevenção de lesões na epiderme induzidas pela radiação UVB em camundongos Balb/c

Effect of propolis in the prevention of injury in epidermis induced by UVB radiation in mice Balb/c

Lamara Laguardia Valente Rocha, D.Sc.*, Bárbara Dutra da Silva Luz**, Douglas Augusto Machado da Silveira**, Michele Braz dos Santos**, Luiz Henrique Laguardia Rocha***, Silvia Laguardia****, Mario Antônio Baraúna, Ft., D.Sc.*****, Marcus Vinicius de Mello Pinto, Ft., D.Sc.*****

.....
Laboratório de Morfologia, Instituto de Ciências da Saúde, Unidade II, Centro Universitário de Caratinga/MG, **Laboratório de Morfologia, Centro de Estudos em Biologia, Unidade II, Centro Universitário de Caratinga/MG, *Graduando do curso de Medicina, UNEC, Unidade II, Centro Universitário de Caratinga/MG, ****Graduanda do curso de Medicina, UNINCOR, Campus BH, Belo Horizonte/MG, *****Núcleo de Tratamento das Desordens Craniofaciais e Reparo Tecidual da Universidade Católica de Petrópolis, Petrópolis/RJ*

Resumo

Parcela cada vez maior de pessoas se expõe à radiação ultravioleta sem a devida proteção, no entanto, essa radiação quando excessiva causa uma quebra na homeostasia existente na pele, podendo causar vários danos, entre outros o câncer de pele. O objetivo deste estudo experimental foi avaliar a possível ação da própolis na prevenção do fotoenvelhecimento induzido através da radiação ultravioleta B, a partir de alterações estruturais da epiderme de camundongos Balb/c. Foram utilizados 42 camundongos machos, pesando em média 28 g, distribuídos em 6 grupos experimentais: Controle; Radiação ultravioleta b; Creme com 25% de própolis; Creme com 50% de própolis; Creme com 25% de própolis + Radiação ultravioleta B; Creme com 50% de própolis + Radiação ultravioleta B. Praticou-se a tricotomia, e em seguida os animais receberam os tratamentos no período de seis semanas. Ao fim do período os grupos foram submetidos à eutanásia, para a coleta da pele. Todo o material foi fixado e destinado à inclusão em parafina e microtomia. As lâminas com os cortes de pele foram coradas por hematoxilina-eosina. A análise histológica revelou que o creme de própolis atenuou significativamente os danos causados pela radiação ultravioleta B, demonstrando um efeito de proteção contra o fotoenvelhecimento.

Palavras-chave: antioxidante, epiderme, radiação ultravioleta, própolis.

Abstract

An increasing number of people are exposed to ultraviolet radiation without protection, however, excessive exposure to radiation determine a breakdown in homeostasis in the skin, causing severe damage, including skin cancer. The aim of this study was to evaluate the effect of propolis in the prevention of photoaging induced by ultraviolet B radiation from structural in the epidermis of mice (Balb/c). We used 42 male mice, weighing on average 28 g, divided into 6 experimental groups: control; irradiated with UVB and non-treated; treated with propolis cream 25% and non-irradiated; treated with propolis cream 50% and non-irradiated; irradiated with UVB and treated with propolis cream 25%; irradiated with UVB and treated with propolis cream 50%. The animals were shaved and treated within six weeks. At the end of the period the groups were euthanized to harvest the skin. All material was fixed and included in paraffin for microtomy. Slides with sections of skin were stained with hematoxylin-eosin. Histological analysis revealed that the cream of propolis significantly attenuated the damage caused by ultraviolet B, demonstrating a protective effect against photoaging.

Key-words: photoaging, skin, ultraviolet B radiation and propolis.

Recebido em 25 de janeiro de 2011; aceito em 15 de março de 2011.

Endereço para correspondência: Lamara Laguardia Valente Rocha, Av. Moacir de Matos no, 36 Vila Onze 35300-100 Caratinga MG, Tel: (33) 3321-3675, Email: lamara.laguardia@gmail.com, Marcus Vinicius de Mello Pinto, orofacial_1@hotmail.com

Introdução

Pesquisas recentes apontam que parcela cada vez maior de pessoas se expõe excessivamente ao sol em horários impróprios e sem efetiva proteção solar, muitas vezes sem considerar os efeitos que a radiação ultravioleta (RUV) pode ter como o fotoenvelhecimento e o câncer de pele [1,2]. Outro fator que tem contribuído para aumento do risco à saúde, promovido pela RUV, relaciona-se ao problema ambiental gerado pela ação antrópica, que tem contribuído para a destruição da camada de ozônio, expondo os seres vivos, inclusive o homem, a seus efeitos deletérios.

A luz solar é a principal fonte de radiação que nos envolve. A radiação ultravioleta da luz solar é crucial para a síntese de vitamina D na pele e em outros aspectos fisiológicos da vida humana. Entretanto, estas radiações são formas de energia que, quando interagem com a matéria viva, produzem efeitos biológicos diversos. O resultado da interação luz e pele determina efeitos nocivos causados pelo estresse oxidativo, ocasionando uma variedade de efeitos patológicos, como queimaduras, mudanças de pigmentação da pele, alterações imunológicas e neoplasias [3-5].

Podendo ser dividida em três categorias a radiação ultravioleta (UV) da luz solar é classificada, dependendo do comprimento de onda em: UVC, 200-280 nm; UVB, 280-315 nm; UVA, 315-400 nm. A camada de ozônio estratosférica tem capacidade de bloquear comprimentos de onda menores de 290 nm, filtrando cerca de 70-90% da radiação UVB (RUVB). No entanto, em um estudo feito por Frederick [6], desde 1970, verifica-se uma diminuição substancial na camada de ozônio com um aumento do alcance da RUVB na superfície da Terra, o que foi particularmente percebido na Antártida.

Assim como revisado por Okigami [7] inúmeros estudos têm demonstrado que uma das principais causas dos danos causados pela radiação é a produção de radicais livres (RL). Oxidações químicas e enzimáticas envolvendo a formação de RL aceleram esse fenômeno de envelhecimento. Os RL são espécies químicas constituídas de um átomo ou associação dos mesmos, possuindo um elétron desemparelhado na sua órbita mais externa. Essa situação implica em alta instabilidade energética e cinética, e para se manterem estáveis precisam doar ou retirar um elétron de outra molécula. A formação de RL conduz ao estresse oxidativo, processo no qual estes iniciarão uma cadeia de reações, originando alterações em proteínas extracelulares e a modificações celulares. Para evitar esse processo de depleção celular, a pele possui seu próprio mecanismo de defesa, entretanto, a capacidade protetora diminui com o envelhecimento [8].

A pele protege o organismo contra substâncias lesivas e contra a dessecação, auxilia na regulação da temperatura corpórea, excreta água, gordura e algumas outras substâncias. Consiste em duas partes principais: a epiderme e a derme. A epiderme, por ser a camada mais superficial da pele, funciona como interface entre o indivíduo e o meio ambiente. Deri-

vada do ectoderma, ela é constituída por epitélio escamoso estratificado queratinizado e claramente separada em quatro camadas: camada germinativa ou basal, camada espinhosa, camada granulosa e camada córnea. As células indiferenciadas da camada basal deslocam-se em direção à camada córnea, transformando-se em células bem diferenciadas e completamente queratinizadas [9]. A repetida exposição da pele ao UVB resulta em um fenótipo de pele envelhecida, incluindo aumento significativo da espessura da epiderme, formação de rugas e diminuição da elasticidade [10-12].

O método mais efetivo de prevenir o fotoenvelhecimento e suas malignidades é evitar a exposição direta aos raios ultravioleta, fazendo uso de barreiras físicas como chapéu e vestuário adequado e uso de protetores solares. O uso diário do filtro solar é o principal caminho para evitar os efeitos danosos da radiação não só no retardo da instalação do fotoenvelhecimento, mas, principalmente, na prevenção de seu efeito mais temido, o câncer da pele [13].

Em decorrência do crescente aumento de doenças de pele relacionadas à exposição UV, faz-se necessária a avaliação da efetividade de novos princípios ativos com finalidade de proteção contra as radiações.

A aplicação tópica ou oral de antioxidantes representa uma estratégia interessante de proteção cutânea contra o estresse oxidativo ocasionado por diferentes agentes. Além da reposição utilizando moléculas endógenas, buscam-se novas substâncias com ação antioxidante, bem como outras que irão aumentar direta ou indiretamente os níveis endógenos dos antioxidantes [14].

A própolis é uma substância resinosa colhida pelas abelhas melíferas de diferentes exudatos de plantas, tais como secreções de árvores, folhas e flores. Esta resina é utilizada pelas abelhas na proteção da colméia contra a proliferação de microrganismos, incluindo fungos e bactérias. Devido à grande variabilidade da flora brasileira, a composição química da própolis é extremamente complexa, possuindo muitos compostos fenólicos que apresentam como característica a atividade antioxidante [15,16]. Além disso, existem tipos de própolis diferentes como a verde, vermelho e marrom que segundo alguns autores, apresentam composição química variada e poder antioxidante diferenciado [17].

No entanto, não se tem completamente esclarecido a que se deve o efeito antioxidante da própolis, se somente aos compostos fenólicos que a compõem ou a ação conjugada de todos os vários ativos que a formam. Neste sentido, Teixeira e cols. [18] discutem a dificuldade em atribuir eficácia antioxidante para um número limitado de componentes de misturas complexas, tais como é o caso da própolis, pois sua ação contra RL pode ser resultante da sinergia entre seus componentes.

Este trabalho, a partir da produção de um creme usado como veículo do extrato etanólico da própolis verde teve por objetivos avaliar sua possível ação no fotoenvelhecimento induzido através da RUV, a partir de alterações estruturais da epiderme de camundongos Balb/c.

Material e métodos

Extrato de própolis verde

Amostras de 20 gramas da própolis verde triturada e homogeneizada foram transferidas para tubos de ensaio (25 x 180 mm). Em seguida, foram adicionados 250 ml de álcool de cereais a 70%, e feita a extração a 70°C em banho de água por 30 minutos, sob agitação manual constante. Após a extração, as amostras foram centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos a 20°C. Os sobrenadantes obtidos foram armazenados em tubos de ensaio do tipo falcon com tampa de rosca, em refrigerador. Optou-se pelo extrato de própolis a 70% de etanol por este apresentar maior atividade antioxidante [19].

Avaliação da atividade antioxidante

Para avaliação da atividade antioxidante do extrato obtido utilizou-se permanganato de potássio ($KMnO_4$) como agente oxidante. Para determinar o índice de oxidação na própolis, foi retirado 1 ml da solução do extrato alcoólico de própolis e colocado em um tubo de ensaio. Adicionou-se na solução 1 ml de ácido sulfúrico 20%, agitando o tubo manualmente por 1 minuto, em seguida acrescentou-se 2 ml de permanganato de potássio 0,1 N. Com a ajuda de um cronômetro foi medido o tempo gasto para descolorir a solução de permanganato (mudança de coloração de roxo para amarelo), que determina o índice de oxidação. Na avaliação do índice de oxidação, valores de até 22 segundos indicam atividade antioxidante [20,21].

Desenvolvimento da formulação tópica contendo extrato de própolis

A formulação foi desenvolvida no laboratório de Farmacotécnica do Centro Universitário de Caratinga em parceria com a Universidade Católica de Petrópolis. Neste trabalho optou-se pela formulação de um creme água-em-óleo, por este apresentar como característica a diminuição da perda de água, aumentar a hidratação e, assim, aumentar a absorção percutânea [22].

Foram manipulados 200 g do creme contendo o extrato alcoólico própolis, sendo 100 g na concentração de 25% (creme A) e 100 g na concentração de 50% (creme B), por meio da seguinte técnica: 1) foram pesados todos os componentes da fase oleosa (F1) do creme nas seguintes proporções: cera não iônica (cosmowax) (15,70%), óleo mineral (vaselina líquida) (7,00%), propilparabeno (Nipazol) (0,10%) e BHT (0,07%), em seguida foram aquecidos até 80°C; 2) foram pesados todos os componentes da fase aquosa (F2) nas seguintes proporções: metilparabeno (Nipagim) (0,20%), propilenoglicol (5,00%), EDTA (0,14%) e água destilada q.s.p., em seguida foram também aquecidos até 80°C; 3) a F2 foi vertida sobre a F1, e em seguida, agitou-se lentamente; 4) as fases foram homogeneizadas até o momento do resfriamento (aproximadamente 30°C); 5) foram adicionados a mistura, silicone volátil (2,80%) e germinal a 50% (0,85%) e homogeneizou-se novamente a mistura [23].

Características organolépticas

A formulação em estudo foi observada durante um mês quanto as suas características de estabilidade de cor, homogeneidade e separação de fases. Sendo que a separação de fases foi testada frente à centrifugação, com o uso de 2 g de cada amostra (formulações com e sem extratos) e centrifugados a 3000 rpm por 30 minutos. O critério de aceitabilidade foi a não ocorrência de separação de fases. O teste foi feito em duplicata [24].

Grupos experimentais

Foram utilizados 42 camundongos Balb/c machos, provenientes do Biotério da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), com onze semanas de idade e aproximadamente 28 g e separados em grupos como mostra a Tabela I.

Tabela I - Grupos experimentais utilizados no estudo.

Grupos experimentais	Nº de animais
1. Controle	7
2. Não irradiado e tratado com o creme A	7
3. Não irradiado e tratado com o creme B	7
4. Irradiado e tratado com o creme A	7
5. Irradiado e tratado com o creme B	7
6. Irradiado com UV/B e sem tratamento	7
Total	42

Os grupos de sete animais foram distribuídos em gaiolas de plástico, com água e alimento a vontade e ciclos de luz/escuro de 12 horas. Este experimento foi avaliado pela Comissão de Ética do Centro Universitário de Caratinga da Fundação Educacional de Caratinga.

Indução de fotoenvelhecimento

Os camundongos foram alojados em gaiola de plástico e submetidos à irradiação por uma lâmpada UV/B (Philips TL40W/ UV/B medical) a uma distância de 20 cm. O tratamento se iniciou dois dias após tricotomia e prolongou-se por 6 semanas. A administração do creme foi feita por passagem manual, 20 minutos antes da irradiação, tempo esse necessário para que o creme fosse em parte absorvido pela pele. Os animais dos grupos 2 e 4 foram tratados com creme A e os animais dos grupos 3 e 5 foram tratados com creme B.

A radiação ultravioleta B (RUV/B) foi irradiada nos grupos 4, 5 e 6 três vezes na primeira semana por 1 min. O tempo de exposição foi posteriormente aumentado para 2 min, 3 vezes por semana na 2ª semana, 3 min, 3 vezes na 3ª semana e 4 min, 2 vezes na 4ª semana, e finalmente 3 min 7 vezes nas 5ª

e 6ª semanas. Os animais do grupo controle foram expostos a uma lâmpada normal para que fossem submetidos a estresse parecido com os que estavam sendo submetidos à RUV/B [11].

Obtenção de material histológico

Os animais foram tratados durante 42 dias. Após esse período foram anestesiados com sobre-dose de Pentobarbital e, posteriormente, foi feita a retirada da pele na região dorsal mediana craniocaudal do animal medindo 2,0 cm de comprimento, que foi fixada em formol 10% tamponado por 24h. Posteriormente, foram transferidos para álcool 70% por mais 24h. Em seguida os fragmentos foram desidratados em álcool etílico em concentrações crescentes, diafanizados pelo xilol, impregnados pela parafina líquida em estufa regulada à temperatura de $\pm 58^{\circ}\text{C}$ e finalmente incluídos em parafina. Os blocos foram cortados em micrótomo (Ek Micro, Eikonal do Brasil), ajustado para 7 micrômetros. Foi produzida uma lâmina para cada animal e em cada uma delas foram colocados cinco cortes. Em sequência, as lâminas foram submetidas à técnica de coloração pela hematoxilina-eosina (H.E).

Análise morfométrica

Para a morfometria foram fotografados 15 campos para cada lâmina de cada um dos 42 animais. Assim, foram obtidas três fotos em campos aleatórios em cada um dos cinco cortes da lâmina do animal. Estas imagens foram capturadas por um sistema utilizando câmera adaptada ao microscópio (Ken-a-vision 2103). Esta captura foi feita utilizando objetiva de 40x. As 15 imagens foram, então, analisadas em programa de análise de imagem (Image Pro-Plus, versão 4.0 - Media Cybernetics). Neste programa avaliou-se em cada uma das 15 fotos de cada animal, através de retículo com 247 pontos, um total de 3705 pontos/animal. Foram considerados como parâmetros para análise o número de núcleos de células da epiderme e a espessura desta camada da pele. Para medir a espessura da epiderme, realizaram-se três medidas aleatórias, em cada uma das quinze fotos de cada animal, contabilizando o total de 45 medidas/animal. A espessura final da epiderme foi calculada como média destas 45 avaliações.

Análises estatísticas

Os dados obtidos nas análises morfométricas foram submetidos à análise de variância *Anova One Way*, e as médias foram comparadas pelo teste Student-Newman-Keuls a 5% de probabilidade.

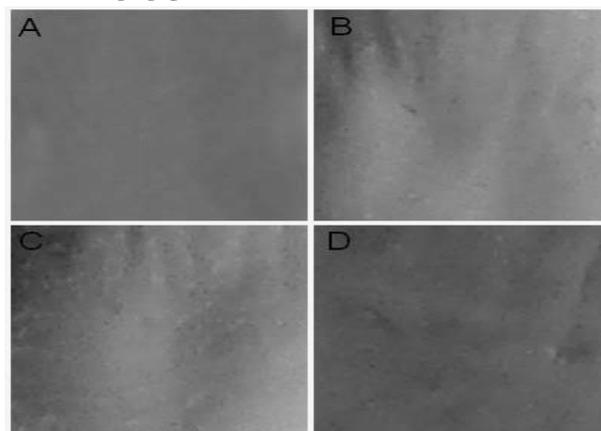
Resultados

Na análise da atividade antioxidante da própolis registrou-se um tempo máximo de 6 segundos para o teste de Permanganato de Potássio, o que sugere sua ação antioxidante.

Na avaliação da propriedade organoléptica do creme produzido observou-se que, ao final de trinta dias, houve modificações de cor e odor, separação de fases e formação de precipitados somente no creme B, o que inviabiliza a sua produção comercial por ter a sua estabilidade comprometida.

Na análise macroscópica da pele dos animais foi observada hiperpigmentação no grupo experimental submetido à irradiação com UVB e sem a aplicação do creme de própolis (Figura 1).

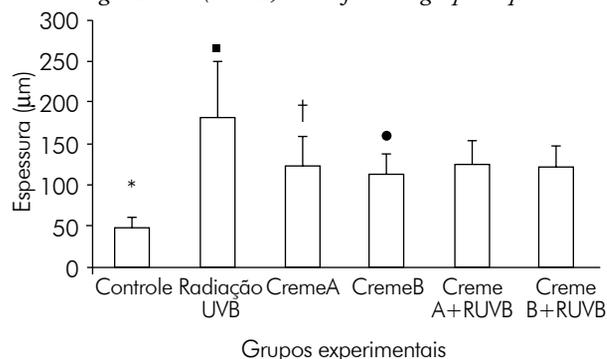
Figura 1 - Foto da pele dos animais ao fim do experimento podendo-se observar hiperpigmentação.



(*) presentes somente no grupo que foi irradiado e não tratado com o creme. **A.** Controle; **B.** Tratados com Creme A + RUV/B; **C.** Tratados com Creme B + RUV/B; **D.** Só irradiados com RUV/B.

Após a análise estatística foram encontradas diferenças significativas, para os parâmetros número de núcleos de células da epiderme e espessura desta camada pele na comparação feita entre os grupos controles e aqueles submetidos à RUV tratados com cremes de própolis.

Figura 2 - Gráfico da variação média da espessura da epiderme de camundongos Balb/c ($n = 42$) dos diferentes grupos experimentais.



Para o teste de Newman Keuls: * $P < 0,05$ para Controle X UVB, controle X creme A; Controle X creme B; controle X creme A + UVB; Controle puro X creme B + UVB. ■ $P < 0,05$ para UVB X creme A, UVB X creme B; UVB X creme A+UVB; UVB X creme B+UVB. Para o teste de Mann-Whitney: † $P = 0,0438$ Creme A X Creme B. ● $P = 0,0193$ Creme B X Creme B + RUVB.

A análise da Figura 2 sugere que em todos os tratamentos (UVB: $182,88 \pm 67,5$; Creme A: $123 \pm 36,8$; Creme B: $113,2 \pm 25,9$; creme A + UVB: $126,1 \pm 28,4$; creme B + UVB: $121,4 \pm 26,7$) utilizados houve um aumento significativo da espessura da pele quando se compara ao controle ($47,1 \pm 12,4$). Observa-se também que com a irradiação UVB, os animais que não foram tratados com formulações contendo própolis apresentaram os maiores espessamentos da epiderme ao final do experimento. Em relação à ação dos cremes de própolis sobre a espessura da epiderme (Creme A: $123 \pm 36,8$; Creme B: $113,2 \pm 25,9$), observou-se também um efeito positivo nesse espessamento, porém com aumentos significativamente menores do que o observado naqueles animais submetidos somente a irradiação com UVB ($182,88 \pm 67,5$). É importante também observar que o creme A ($123 \pm 36,8$) promoveu um aumento significativamente maior na espessura da epiderme em comparação ao observado nos animais tratados com creme B ($113,2 \pm 25,9$).

Ainda segundo o registrado na figura 2 e considerando a possível ação protetora da própolis utilizada na produção dos dois cremes aqui empregados, verificou-se que a aplicação desses em animais submetidos à UVB (creme A + UVB: $126,1 \pm 28,4$; creme B + UVB: $121,4 \pm 26,7$), não inibiu completamente o espessamento da epiderme, apesar de ter reduzido este efeito de maneira significativa, em comparação àqueles animais irradiados e não tratados com própolis (UVB: $182,88 \pm 67,5$). Identifica-se também a ação preventiva mais eficiente do creme B (creme B + UVB: $121,4 \pm 26,7$) que promoveu espessamento menor da epiderme em comparação ao grupo que, antes da irradiação, foi tratado com o creme A (creme A + UVB: $126,1 \pm 28,4$).

Registra-se também o observado no gráfico 3, que aponta para a falta de significância entre os resultados do espessamento da epiderme nos grupos somente tratados com creme A ($123 \pm 36,8$) e aquele que antes de ser irradiado com UVB foi submetido à aplicação tópica deste mesmo creme (creme A + UVB: $126,1 \pm 28,4$).

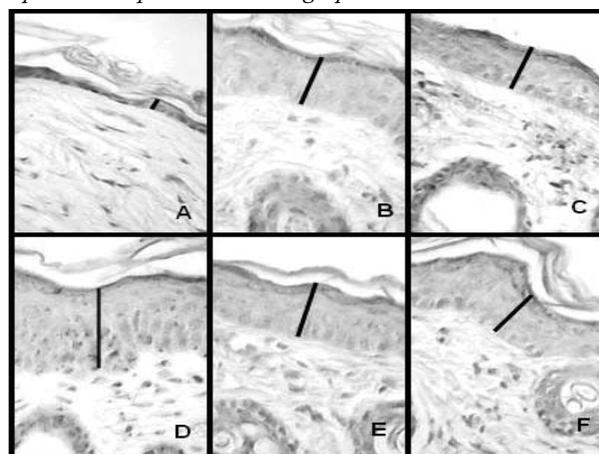
A Figura 3 apresenta imagens obtidas em microscopia de luz e registra a espessura da epiderme em cada um dos grupos experimentais utilizados.

A Figura 3 também permite observar as variações na espessura da epiderme confirmando todos os resultados obtidos na morfometria para a espessura da epiderme já descrita. Outro parâmetro considerado na morfometria foi o número de núcleos de células em nossos grupos e, mais uma vez, observou-se resultados significativamente diferentes entre os grupos experimentais.

Em relação à hiperplasia determinada pelo aumento no número de células da epiderme, registrada na Figura 4, identifica-se que em todos os tratamentos (UVB: $41,0 \pm 11,3$; Creme A: $29,7 \pm 6,07$; Creme B: $28,0 \pm 5,12$; Creme A + RUVB: $32,9 \pm 5,63$; Creme B + RUVB: $33,5 \pm 6,36$) houve aumento significativo do número de células em comparação ao controle (Controle: $23,9 \pm 5,82$). No grupo que sofreu somente irradiação com UVB (UVB: $41,0 \pm 11,3$) este aumento foi maior do que em todos os outros. A aplicação dos

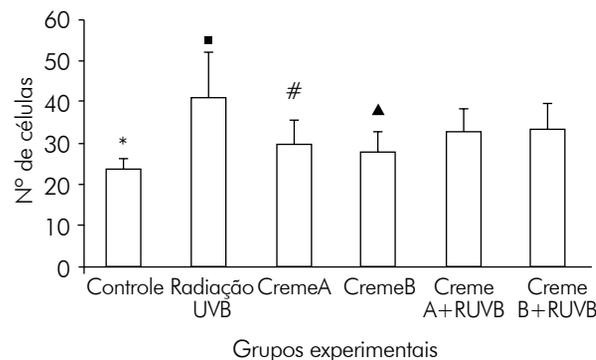
cremes A e B (Creme A: $29,7 \pm 6,07$; Creme B: $28,0 \pm 5,12$) promovem aumento de células epidérmicas com intensidade semelhante entre si e menor do que nos grupos somente irradiados com UVB. Houve também aumento significativo no efeito proliferativo de células no grupo dos animais somente irradiados (UVB: $41,0 \pm 11,3$) em comparação aos grupos que foram irradiados, mas submetidos ao tratamento como creme A ($32,9 \pm 5,63$) ou com o creme B ($33,5 \pm 6,36$) em animais com UVB (UVB: $41,0 \pm 11,3$), não houve diferença significativa no efeito proliferativo das células epidérmicas.

Figura 3 - Fotomicrografias da pele dos camundongos evidenciando a espessura da epiderme de cada grupo.



A. Controle; **B.** Creme A; **C.** Creme B; **D.** Radiação UVB; **E.** Creme A + RUVB; **F.** Creme B + RUVB. Coloração H.E. 200x. Observar que o controle (A) apresenta menor espessura da epiderme em relação aos demais grupos, e em D maior espessamento da epiderme, a ausência de diferença na espessura da epiderme entre os grupos B e E, Espessamento de F maior do que em C.

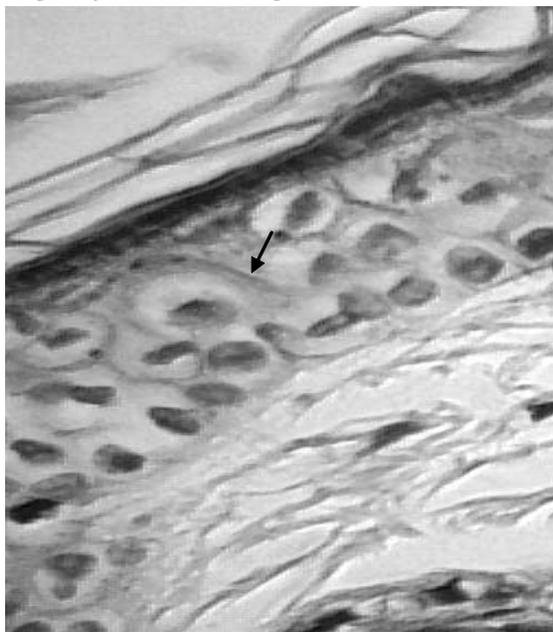
Figura 4 - Gráfico da variação no número de núcleos de células da epiderme de camundongos balbC (n = 42) dos diferentes grupos experimentais.



Para o teste de Newman Keuls: * $P < 0,05$ para Controle X UVB; Controle X creme A; Controle X creme B; Controle X creme A + UVB; Controle X creme B +UVB. ■ $P < 0,05$ para UVB X creme A, UVB X creme B; UVB X creme A+UVB; UVB X creme B+UVB. # $P < 0,05$ para Creme A X Creme A + RUVB; Creme A X Creme B+RUVB. • $P < 0,05$ para Creme B X Creme A+RUVB; Creme B X Creme B+RUVB.

Para que formulações tópicas adicionadas de extrato de própolis apresentem efeito fotoquimioprotetor é necessário que os compostos antioxidantes ultrapassem o estrato córneo e fiquem retidos nas camadas mais inferiores da pele [24]. Observou-se nos estudos histológicos que a epiderme apresentava células hipertrofiadas, o que sugere que o creme foi em parte absorvido pela epiderme. Esse processo foi observado com maior frequência nos animais que utilizaram o creme A (Figura 5).

Figura 5 - Fotomicrografia da pele do camundongo evidenciando (seta) hipertrofia das células da epiderme.



Discussão

Na avaliação do índice de oxidação, segundo a legislação brasileira [20], valores de até 22 segundos indicam atividade antioxidante. Na própolis estudada os resultados das análises de atividade antioxidante ficaram abaixo de 6 segundos. A atividade antioxidante da própolis pode variar, como, por exemplo, Sousa *et al.* [25] encontraram em extratos de própolis de diferentes cidades a variação de $9,0 \pm 1,58$ a $54,75 \pm 1,97$ segundos, essa diferença na atividade antioxidante observada mesmo para os extratos de origem brasileira demonstra que a composição química da própolis depende da especificidade da flora no local de coleta.

A estabilidade física do creme foi avaliada, uma vez que este teste pode fornecer algumas informações sobre a estabilidade física da formulação ao longo de sua vida de prateleira e o desempenho no momento do uso. Sendo assim, foi evidenciado que a quantidade do extrato da própolis exerceu influência significativa na estabilidade das formulações, sendo que o creme A apresentou maior estabilidade em relação ao creme B. Resultado esse que possivelmente se deve à hidrólise do tensoativo, pela grande quantidade do extrato de própolis.

Nossos resultados apontam para o efeito deletério da RUV/B sobre a epiderme de camundongos Balb/c, promovendo o aumento da espessura dessa camada da pele pelo estímulo a hiperplasia difusa, o que caracteriza o quadro de acantose [26].

Segundo Haratake *et al.* [27], a radiação UVB tem efeito deletério sobre a pele causando a hiperplasia. Este espessamento da pele, que inicialmente se comporta como um processo regulado pode estar relacionado a alterações que posteriormente induziriam ao câncer de pele [28].

A aplicação tópica da própolis tem sido amplamente estudada e demonstrando muitas vezes efeitos terapêuticos positivos no tratamento de várias patologias [29,23].

Na análise macroscópica da pele dos camundongos foi observada hiperpigmentação no grupo experimental somente irradiado com UVB, possivelmente a própolis, por ter ação antioxidante, ofereceu proteção ao núcleo evitando que fosse necessária uma aceleração na síntese de melanina pelos melanócitos, a fim de evitar os efeitos deletérios ao DNA feitos pela radiação ultravioleta [30].

O uso da própolis incorporada ao creme, utilizado em nosso trabalho, sugere que esta substância apresenta capacidade de modular este efeito lesivo promovido pela UVB, pois quando associada à exposição de UVB, permite ao organismo promover uma resposta de proliferação celular menos evidente. Resultado esse semelhante ao encontrado por Fonseca *et al.* [17] onde diferentes extratos de própolis demonstraram efeitos contra o estresse oxidativo na pele causados pela UVB.

A medida da espessura mostrou que não houve diferença significativa entre o grupo experimental tratado com o creme A e do grupo tratado com creme A + RUV/B, o que indica que o creme A demonstrou uma maior eficácia na proteção da epiderme contra o RUVB, do que o creme B.

Conclusão

A partir deste estudo observamos que a aplicação tópica dos cremes com extrato de própolis evitou que se formassem manchas de hiperpigmentação na pele dos camundongos, assim como atenuou significativamente o espessamento e a hiperplasia da pele induzidas pela RUVB. Tendo assim uma potencial aplicação na prevenção de patologias causadas pela proliferação descontrolada de células.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Sr. Célio Costa que cedeu gentilmente a própolis utilizada neste estudo. Agradecemos à FAPEMIG pela bolsa de Iniciação Científica concedida. *Suporte Financeiro:* FAPEMIG.

Referências

1. Costa FB, Weber MB. Avaliação dos hábitos de exposição ao sol e de fotoproteção dos universitários da Região Metropolitana de Porto Alegre/RS. *An Bras Dermatol* 2004;79(2):149-55.

2. Silva AC, Tommaselli JTG, Corrêa MP. Estudo retrospectivo dos casos novos de câncer de pele diagnosticados na região oeste do estado de São Paulo, Brasil. *Hygeia* 2008;4:1-14.
3. Azulay RD, Azulay DR. 1999. *Dermatologia*. 2ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999. p.403-15.
4. Juchem PP, Hochberg J, Winogron A, Ardenghy M, English R. Riscos à saúde da radiação ultravioleta. *Rev Soc Bras Cir Plast* 1998;13:31-60.
5. Sgarbi FC, Carmo ED, Rosa LEB. Radiação ultravioleta e carcinogênese. *Rev Ciênc Méd* 2007;16:245-50.
6. Frederick JE, Snell HE. Ultraviolet radiation levels during the Antarctic spring. *Science* 1988;241(4864):438-40.
7. Okgami H. 1997. Irradiação UV, radicais livres, varredores de radicais livres e a pele. *J Biomolec Med Free Rad* 1977;3(1):6-11.
8. Hirata LL, Sato MEO, Santos CAM. Radicais livres e o envelhecimento cutâneo. *Acta Farm Bonaer* 2004;23:418-24.
9. Bailey FR, Bailey C, Copenhaver WM, Bunge RP, Bunge MP. 1973. *Histologia*. 1ª ed. São Paulo: Edgard Blucher; 1973. p. 307-11.
10. Inomata S, Matsunaga Y, Amano S, Takada K, Kobayashi K, Tsunenaga M, et al. Possible involvement of gelatinases in basement membrane damage and wrinkle formation in chronically ultraviolet B-exposed hairless mouse. *J Invest Dermatol* 2003;120(1):128-34.
11. Tanaka M, Koyana Y, Nomura Y. Effects of Collagen Peptide Ingestion on UV-B- Induced Skin Damage. *Biosci Biotechnol Biochem* 2009;73:930-32.
12. Tsukahara K, Moriwaki S, Fujimura T, Takema Y. 2001. Inhibitory effect of an extract of *Sanguisorba officinalis* L. on ultraviolet-B-induced photodamage of rat skin. *Biol Pharm Bull* 2001;24:998-1003.
13. Montagner S, Costa A. Bases biomoleculares do fotoenvelhecimento. *An Bras Dermatol* 2009;84:263-9.
14. Guaratini T, Medeiros MHG, Colepicolo P. Antioxidantes na manutenção do equilíbrio redox cutâneo: uso e avaliação de sua eficácia. *Quím Nova* 2007;(30):206-13.
15. Silva RA, Rodrigues AE, Ribeiro CM, Custódio AR, Andrade NED, Pereira WE. 2006. Características físico-químicas e atividade antimicrobiana de extratos de própolis da Paraíba, Brasil. *Ciênc Rural* 2006;36:1842-8.
16. Teixeira EW, Negri G, Meira RMSA, Message D, Salatino A. Plant origin of green propolis: bee behavior, plant anatomy and chemistry. *Evid Based Complement Alternat Med* 2005;2(1):85-92.
17. Fonseca YM, Marquele-Oliveira F, Vicentini FTMC, Furtado NAJC, Sousa JPB, Lucisano-Valim YM, et al. Evaluation of the potential of Brazilian propolis against UV-induced oxidative stress. *Evid Based Complement Alternat Med* 2011;2011:1-8.
18. Teixeira EW, Message D, Negri G, Salatino A, Stringheta PC. 2010. Seasonal variation, chemical composition and antioxidant activity of Brazilian propolis samples. *Evid Based Complement Alternat Med* 2010;7(3):307-15.
19. Park YK, Ikegaki M, Abreu JAS, Freire NM. 1998. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. *Ciênc Tecnol Aliment* 1998;18:313-8.
20. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa nº3, 2001 [online]. Disponível em URL: <http://www.cesa.rs.gov.br/textos/armazenagem.pdf>
21. Farmacopéia Brasileira. 4ª ed. Brasília: Anvisa; 1977. p. 988.
22. Arndt KA. Manual de Terapêutica Dermatológica. 4ª ed. São Paulo: Medsi; 1990.
23. Vieira AP, Santos NR, Borges JHS, Vincenzi MPA, Schmitz WO. Ação dos flavonóides na cicatrização por segunda intenção em feridas limpas induzidas cirurgicamente em ratos Wistar. *Semina Ciênc Biol Saúde* 2008;29:65-74.
24. Marquele-Oliveira F. Desenvolvimento de formulações tópicas fotoquimioprotetoras contendo o extrato de própolis: estudo de estabilidade, permeação e retenção cutânea in vitro e de eficácia in vivo [Tese]. Ribeirão Preto: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da USP; 2007. 155p.
25. Sousa JPB, Furtado NAJC, Jorge R, Soares AEE, Bastos JK. Perfis físico-químico e cromatográfico de amostras de própolis produzidas nas microrregiões de Franca (SP) e Passos (MG), Brasil. *Rev Bras Farmacogn* 2007;17:85-93.
26. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. *Patologia. Bases patológicas das doenças*. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005. 1592 p.
27. Haratake A, Uchida Y, Mimura K, Elias PM, Holleran WM. 1997. Intrinsically aged epidermis displays diminished UVB-induced alterations in barrier function associated with decreased proliferation. *J Invest Dermatol* 1997;108:319-23.
28. Brasileiro-Filho G. *Bogliolo Patologia*. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.
29. Santos MJ, Vianna LAC, Gamba MA. 2007. Avaliação da eficácia da pomada de própolis em portadores de feridas crônicas. *Acta Paul Enferm* 2007;20:199-204.
30. Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica*. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999.