



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Rodrigo da Cruz Ferreira

**ELABORAÇÃO DE FORMULAÇÃO SEMISSÓLIDA COM
POTENCIAL FARMACÊUTICO À BASE DE EXTRATO DA
GEOPRÓPOLIS DA *Melipona quadrifasciata anthidioides*
(MANDAÇAIA)**

Salvador
2021

Rodrigo da Cruz Ferreira

**ELABORAÇÃO DE FORMULAÇÃO SEMISSÓLIDA COM
POTENCIAL FARMACÊUTICO À BASE DO EXTRATO DA
GEOPRÓPOLIS DA *Melipona quadrifasciata anthidioides*
(MANDAÇAIA)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia do Instituto de Ciências da Saúde (ICS) da Universidade Federal da Bahia (UFBA), como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Lidércia Cavalcanti Ribeiro Cerqueira e Silva
Co-orientador Prof Dr^o Fábio Alexandre Chinalia

Salvador
2021

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA), com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Ferreira, Rodrigo da Cruz
Elaboração de formulação semissólida com potencial farmacêutico à base de extrato da Geoprópolis da Melipona Quadrifasciata Anthidioides (Mandaçaia) / Rodrigo da Cruz Ferreira. -- Salvador, 2021.
252 f.: il.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lidércia Cavalcanti Ribeiro Cerqueira e Silva.

Coorientador: Prof. Dr. Fábio Alexandre Chinalia.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-graduação em Biotecnologia do Instituto de Ciências da Saúde) - Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, 2021.

1. Melipona Quadrifasciata Anthidioides. 2. Geoprópolis. 3. Multielementos. 4. IOES. 5. HPLC. I. Cavalcanti Ribeiro Cerqueira e Silva, Prof^a. Dr^a. Lidércia. II. Chinalia, Prof. Dr. Fábio Alexandre . III. Título.

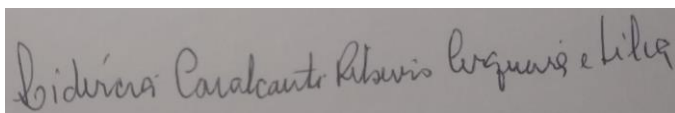
RODRIGO DA CRUZ FERREIRA

Elaboração de Formulação Semissólida com Potencial Farmacêutico à Base do Extrato da Geoprópolis da *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Mandaçaia)

Tese apresentada como requisito para obtenção do grau de Doutor em Biotecnologia pelo Instituto de Ciências da Saúde - ICS da Universidade Federal da Bahia.

Aprovada em 30 de julho de 2021.

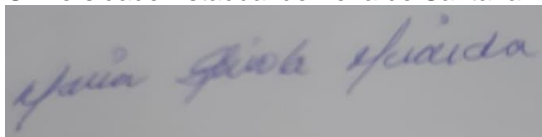
BANCA EXAMINADORA:



Lidércia Cavalcanti Ribeiro Cerqueira e Silva – Orientadora
Doutora em Química pela Universidade Federal da Bahia, UFBA, Brasil.
Universidade Federal da Bahia.



Hugo Neves Brandão
Doutor em Química pela Universidade Federal da Bahia, UFBA, Brasil.
Universidade Estadual de Feira de Santana.



Maria da Pureza Spínola Miranda
Doutora em Ciências dos Alimentos pela Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Universidade Federal da Bahia.



Milleno Dantas Mota
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal da Bahia,
UFBA, Brasil.
Universidade do Estado da Bahia



Ademir Evangelista do Vale
Doutor em Química pela Universidade Federal da Bahia,
UFBA, Brasil
Universidade Federal da Bahia.

DEDICO

Aos meus pais, minha esposa, companheira e meus filhos que me inspiraram o tempo todo nesse trabalho.

AGRADECIMENTOS

À DEUS em primeiro lugar por me proporcionar esta extraordinária aventura da vida.

Aos meus pais, que me incentivaram o tempo todo e me apoiaram incondicionalmente.

À minha esposa, Paloma Ribeiro Meira Ferreira fonte inspiradora e aos meus filhos; Rodrigo da Cruz Ferreira Filho e Benjamin Ribeiro Meira Ferreira por me ajudarem a superar meus limites.

A toda minha família, minha madrinha Carmozina de Araújo Maia, meu avô Ubaldo Rodrigues da Cruz, todos meus tios em especial à minha tia Rosângela Figuerêdo da Cruz e José Tadeu Figuerêdo da Cruz que sempre me apoiaram e vibraram com meu sucesso.

Ao meu amigo veterinário Gustavo Vianna que também me incentivou o tempo todo para que eu realizasse este trabalho. E ao Dr. Paulo Emílio Landulfo Medrado de Vinhaes Torres pela inspiração no mundo acadêmico desde os primórdios da faculdade e durante o tempo que tive a oportunidade de trabalhar com ele.

À CAPES / (FAPESB) pelo apoio financeiro na concessão da bolsa de estudo.

À prof^a Dr^a Lidércia Cavalcanti Ribeiro Cerqueira e Silva que se mostrou uma amiga e uma excelente orientadora, viabilizando informações e conhecimentos importantes na elaboração deste trabalho.

Em especial, ao prof^o Dr^o Fábio Alexandre Chinalia que desde o início mostrou-se solícito e me orientou com destreza e sabedoria me incentivando a pensar.

À prof^a Dr^a Marina Siqueira de Castro (meliponário do Centro de Agroecologia Rio Seco – UEFS CEARIS, pela influência no mundo das abelhas sem ferrão e fornecimento das amostras da geoprópolis).

Ao colega biólogo, Felipe Oliveira Msc em modelagem em Ciências da Terra e do Meio Ambiente. Responsável pelo (Meliponário do Centro de Agroecologia Rio Seco – UEFS), no período da coleta. Este muito solícito ajudou na viabilização do material.

Ao Prof^o Dr^o Hugo Brandão e aos colegas do (LAEX) (LABIV) –UEFS, (Jéssica Lima, Dani, Ane) que me receberam de braços abertos e de certa forma me ajudaram na realização dos experimentos.

A prof^a Dr^a Clicia Capibaribe Leite, e ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Farmácia – UFBA, em especial ao colega Farmacêutico Danilo Vilas Boas pela força imensurável no início do trabalho que colaborou me ajudando com as análises microbiológicas.

Ao prof^o Dr^o Aníbal de Freitas Santos Júnior (UNEB) e a graduanda em Farmácia Fernanda Dias, UNEB, que me apoiaram na realização dos experimentos dos multielementos.

Ao prof^o Dr^o Fábio Dias pelo apoio no tratamento dos dados estatísticos.

Ao Profº Drº Antônio de Oliveira Costa Neto, do colegiado de Agronomia da UEFS, que também me ajudou de forma enriquecedora com seus conhecimentos estatísticos.

A profª Drª Neila de Paula Pereira e a graduanda em Farmácia Alana Oliveira de Sena do laboratório de farmacotécnica da Faculdade de Farmácia da UFBA que abraçaram a ideia de desenvolvermos um produto farmacêutico a base da geoprópolis

A profª Drª Ivana Aparecida Borges Lins integrante do Instituto de Ciência da Informação DDI/ICI/UFBA, pelo apoio moral e primorosa revisão deste trabalho.

Aos colegas do doutorado por vivenciarem as mesmas angústias e aflições nesse período em especial ao prof Milleno Dantas Mota, que sempre se mostrou solícito quando precisei.

À estudante de graduação em Biotecnologia (UFBA), Tainara Sena que iniciou seus trabalhos de iniciação científica PIBIC com este tema colaborando com experimentos da atividade antimicrobiana neste trabalho;

À Universidade Federal da Bahia e todas outras instituições envolvidas nesta pesquisa (UEFS/UNEB) pela estrutura que permitiu a realização de todos os experimentos.

Agradeço, enfim a todos aqueles que participaram ou contribuíram de alguma forma neste trabalho.

*“A tua palavra é lâmpada
que ilumina os meus passos
e luz que clareia o meu
caminho.”*

Salmos 119.105

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Meliponário (modelo de criação de abelhas sem ferrão).	29
Figura 2: Detalhe da abelha mandaçaia vigia, na entrada da colônia.	30
Figura 3: Distribuição geográfica da ocorrência da <i>Melipona quadrifasciata</i> (mandaçaia) no Brasil.	31
Figura 4: Colônia da mandaçaia em cortiços e em tronco de umburana.	31
Figura 5: Abelha sem ferrão <i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i> coletando resinas, néctar e ou pólen.	32
Figura 6: Abelha sem ferrão <i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i> coletando mistura de areia e argila para produção da geoprópolis	32
Figura 7: a) <i>Melipona quadrifasciata quadrifasciata</i> , <i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i> e uma espécie híbrida, da esquerda para direita, b) detalhe dos tergitos abdominais da <i>M. quadrifasciata anthidioides</i> .	33
Figura 8: Geoprópolis da colônia de <i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i> .	40
Figura 9: Grupos biologicamente ativos mais importantes presentes na própolis.	46
Figura 10: Flavonoides encontrados na própolis.	47
Figura 11: Estrutura de lipossomas unilamelar e multilamelar.	53
Figura 12: (A) Lipossoma unilamelar contendo substâncias ativas solubilizadas na fase aquosa e na bicamada lipídica. (B) Corte: Lipossoma unilamelar contendo substâncias ativas transversal de lipossoma unilamelar	53
Figura 13: Epiderme	62
Figura 14: Desenho esquemático da pele	62
Figura 15: Fluxograma das atividades.	69
Figura 16: Origem das amostras da geoprópolis da abelha <i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i> . Localização do Meliponário do Centro de Agroecologia Rio Seco (CEARIS), no município de Amélia Rodrigues-Ba. Na imagem de satélite, detalhe do alcance aproximado do raio de ação das abelhas campeiras.	70
Figura 17: Coleta da geoprópolis, meliponário do CEARIS - UEFS.	71
Figura 18: Fluxograma do preparo do extrato e partição química	76
Figura 19: Extrações Soxhlet / filtração / desidratação.	77
Figura 20: Extrato etanólico e suas partições, diclorometânica e hexânica.	77
Figura 21: Cartucho C18 e filtração em membrana Millipore	78
Figura 22: Extrato etanólico, partições hexânica, diclorometânica e resíduo “torta”	78
Figura 23: Equipamento HPLC (Varian Polaris) Modelo 320 SERIAL N 01763	79
Figura 24: Espectrômetro de Emissão Óptica de Plasma Acoplado Indutivamente (IOES) Agilent 700 SERIES.	80
Figura 25: Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer	84
Figura 26: Esquema da microdiluição em caldo, de acordo com “Metodologia dos testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico” do	88

National Committee for Laboratory Standards (NCCLS).	
Figura 27: Fluxograma do processo de formulação do organogel (PLO-EEGP 5%)	89
Figura 28: a) Detalhe das seringas Lauer lock conectadas, b) Fases oleosa e aquosa/Material utilizado no processo de extrusão	90
Figura 29: Fluxograma do processo de formulação da base semissólida (creme).	91
Figura 30: Extrato Etanólico da Geoprópolis (EEGP) seco, utilizado na incorporação à base semissólida	91
Figura 31: Cromatograma do extrato etanólico com os espectros das substâncias encontradas	144
Figura 32: Cromatograma da fração diclorometânica com os espectros das substâncias encontradas	151
Figura 33: Cromatograma da fração hexânica com os espectros das substâncias encontradas	151
Figura 34: Cromatograma da fração residual (torta) com os espectros das substâncias encontradas	152
Figura 35: Cromatograma da própolis verde padronizada	153
Figura 36: Placa após 24h de incubação. Comportamento do reagente INT em relação ao crescimento microbiano de <i>E. coli</i> .	166
Figura 37: Placa após 24h de incubação. Comportamento do reagente NT em relação ao crescimento microbiano de <i>Staphylococcus aureus</i> .	166
Figura 38: Avaliação da susceptibilidade do extrato etanólico da geoprópolis contra <i>Staphylococcus aureus</i> (triplicata).	168
Figura 39: Antibiograma que avaliou a susceptibilidade do extrato etanólico da geoprópolis contra <i>E. coli</i> (triplicata).	169
Figura 40: Observação da formulação PLO-EEGP 5% em microscópio óptico: Olympus optical model CX40RF100- Objetiva 100x	179
Figura 41: Observação da formulação PLO-EEGP 5% em microscópio óptico: Olympus optical model CX40RF100- Objetiva 40x.	179
Figura 42: Observação da separação de fases na formulação piloto PLO-EEGP 5%, a) Formulação observada após 24h e após 21 dias (b).	180

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Curva de calibração para flavonoides totais equivalentes em quercetina	85
Gráfico 2: Número de depósitos de patentes com os termos "própolis" e "geoprópolis"	95
Gráfico 3: Depósitos de patente com os termos própolis e geoprópolis	95
Gráfico 4: Volume de documento de patentes relacionadas ao termo "própolis" por país depositante.	96
Gráfico 5: Requerentes de documento de patentes relacionadas ao termo "própolis" por país depositante.	96
Gráfico 6: Número de documentos de patentes relacionadas ao termo "própolis" pela CIP.	97
Gráfico 7: Número de documentos de patentes relacionadas ao termo "própolis" por ano de depósito.	98
Gráfico 8: Teor % de carbono (m/m) na digestão da geoprópolis da <i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i> .	118
Gráfico 9: Concentrações de macroelementos (mg/Kg) em amostras da geoprópolis da <i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i> (Meliponinae) de Amélia Rodrigues, Estado da Bahia, Brasil	123
Gráfico 10: Gráfico de pontuação PC1 x PC2 obtido da geoprópolis	136
Gráfico 11: Dendrograma obtido a partir das amostras analisadas da geoprópolis. Distância Euclidiana e método de probabilidade entre pontos	136
Gráfico 12: Projeção das variáveis	137
Gráfico 13: Valores da matriz de correlação	139
Gráfico 14: Rendimento médio do extrato etanólico da geoprópolis x colônia	141
Gráfico 15: Flavonoides, e fenólicos totais encontrados no extrato etanólico (EEGP).	155
Gráfico 16: Fenólicos totais encontrados nas frações diclorometânica, hexânica e resíduo (torta).	155
Gráfico 17: Potencial antioxidante: % de captura do radical DPPH no EEGP.	161
Gráfico 18: Potencial antioxidante: % de captura do radical DPPH nas frações diclorometânica, hexânica e no resíduo (torta) EEGP.	162
Gráfico 19: Dendrograma das amostras da extração etanólica	164
Gráfico 20: PC1 x PC2 do perfil químico-extração etanólica	165
Gráfico 21: Análise do efeito negativo das diferentes concentrações do EEGP na atividade da desidrogenase de <i>E. coli</i> após 4h, 6h, 8h, 12h e 24h de incubação.	167
Gráfico 22: Análise do efeito negativo do EEGP na atividade da desidrogenase de <i>E. coli</i> após 6 e 24h de incubação	167
Gráfico 23: Gráfico de dispersão: ácido gálico x microbiota estudada.	173
Gráfico 24: Gráfico de dispersão: naringenina x microbiota estudada	174
Gráfico 25: Gráfico de dispersão: kampferol x microbiota estudada	174

Gráfico 26: Gráfico de dispersão: campferide x microbiota estudada	175
Gráfico 27: % da atividade antioxidante: Formulação PLO-EEGP 5% x EEGP	182
Gráfico 28: Fenólicos Totais avaliados na formulação PLO-EEGP 5% x EEGP	184
Gráfico 29: Flavonoides totais da formulação PLO-EEGP 5%	185
Gráfico 30: Espalhabilidade (inicial) antes do gelo e degelo/estufa.	192
Gráfico 31: Espalhabilidade após gelo e degelo	193
Gráfico 32: Espalhabilidade após estufa	193

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Plantas catalogadas em fragmento de Mata Atlântica secundária no Centro de Agroecologia Estação Rio Seco (CEARIS).	42
Tabela 2: Diversidade de fruteiras catalogadas e sua abundância relativa, no Centro de Agroecologia Rio Seco - CEARIS. Amélia Rodrigues-BA – 2014	43
Tabela 3: Diversidade de espécies catalogadas entorno do CEARIS (500m a 2.000m). Amélia Rodrigues-BA – 2014.	45
Tabela 4: Condições operacionais de um sistema de digestão por microondas de amostras da geoprópolis em forno de microondas com cavidade	82
Tabela 5: Características do espectrofotômetro.	84
Tabela 6: Composição da formulação PLO-EEGP 5%	90
Tabela 7: Formulação do creme utilizado como base para incorporar o extrato da geoprópolis	92
Tabela 8: Diferentes concentrações de extratos da geoprópolis incorporados na base (creme) obtida.	93
Tabela 9: Patentes com o termo "geopropolis"	100
Tabela 10: Patentes com o termo "própolis"	100
Tabela 11: Quantificação de microrganismos na geoprópolis <i>in natura</i> da <i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i> .	116
Tabela 12: Análise das folhas de espinafre (Material de Referência Certificado - CRM 1570a) e Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), em mg / kg, pelo ICP OES após digestão assistida em microondas (média ± desvio padrão; n = 3 ; Nível de confiança de 95%	117
Tabela 13: Concentração (mg/Kg) de microelementos na geoprópolis da <i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i> (média ± desvio padrão, n = 3, 95% nível de confiança)	119
Tabela 14: Concentração (mg/Kg) de macro elementos e carbono (%) geoprópolis da <i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i> (média ± desvio padrão, n = 3, 95% nível de confiança)	120
Tabela 15: Concentrações (em mg / kg) de elementos micro e potencialmente tóxicos em amostras da geoprópolis relatadas na literatura em comparação com este estudo.	124
Tabela 16: Faixa de concentração do solo (em mg/kg) de elementos potencialmente tóxicos relatados na literatura em comparação com este estudo e efeitos principais no organismo humano.	128
Tabela 17: Limite máximo (IDA) de contaminantes inorgânicos em produtos alimentícios secos (PAS) e no mel	130
Tabela 18: Comparativo de elementos encontrados em diversos trabalhos.	134
Tabela 19: Correlações entre os multielementos.	138
Tabela 20: Parâmetros cromatográficos dos padrões analisados por HPLC (autor)	143
Tabela 21: Resultados dos flavonoides, atividade antioxidante e fenólicos totais	154

encontrados nos EEGP.

Tabela 22: Comparação do potencial antioxidante, fenólicos totais e flavonoides em diferentes própolis	156
Tabela 23: Tabela comparativa da atividade antimicrobiana de diferentes própolis.	172
Tabela 24: Resultados dos testes de centrifugação nas formulações controle e (1,5%) (2,5%) (5%) à base da geoprópolis da <i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i>	189
Tabela 25: Comportamento apresentado pela formulação do creme à base da geoprópolis da <i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i> após ciclo de gelo e degelo 6 dias, alternado 3 dias em refrigerador 8 ° C e 3 dias em temperatura ambiente 21°C	189
Tabela 26: Comportamento apresentado pela formulação do creme à base da geoprópolis da <i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i> após ciclo em estufa 6 dias, alternado 3 dias em estufa a 45 ° C e 3 dias em temperatura ambiente 21°C	190
Tabela 27: Controle do pH com 24h, 30 dias e 90 dias	191

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AL: Alagoas

AM: amostra

ANOVA-Análise de Variância

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASF -Abelhas sem ferrão

ATCC- American Type Culture Collection

BA: Bahia

CLAE FR- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência- Fase Reversa

CONAMA- Conselho Nacional do Meio Ambiente

DNA- Ácido desoxirribonucleico

EUA- Estados Unidos da América

HCA: Análise Hierárquica de Agrupamentos

HPLC-High performance liquid chromatography

ICPOES- Espectrômetro de emissão óptica sequencial com plasma indutivamente acoplado

ICS - Instituto de Ciências da Saúde

IGEO- Instituto de Geociências

INPI- Instituto Nacional da Propriedade Industrial

LABIV- Laboratório de Bioprospecção de Vegetais da UEFS

LAEX - Laboratório de Extração de Produtos Naturais

LAMABI- Laboratório de Microbiologia Aplicada a Biotecnologia e Imunologia

LAPMEC- Laboratório de Farmacotécnica Homeopática /Pesquisa de Medicamentos e Cosméticos. da Faculdade de Farmácia da UFBA.

LOD- Limite de detecção

LOQ- Limite de quantificação

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

min: minuto

nm: nanômetro

NMP- Número Mais Provável

PCA – Análise de Componentes Principais

POP- Procedimento Operacional Padrão

Rpm- Rotação por minuto

SEBRAE- Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas

tR- Tempo de retenção

UEFS- Universidade Estadual de Feira de Santana

UFBA -Universidade Federal da Bahia

UFC- Unidade Formadora de Colônia

UNEB- Universidade do Estado da Bahia

UV- Ultravioleta

LAPAAC – UFBA Laboratório de Pesquisa e Análise de Alimentos e Contaminantes

FAR- Farmácia

LISTA DE SÍMBOLOS

°C: graus centígrados

$\mu\text{g/g}^{-1}$: micrograma por grama

mg/kg^{-1} : miligrama por quilo

Al- Alumínio

As- Arsênio

Ba- Bário

Ca- Cálcio

Cd- Cádmio

Co- Cobalto

Cr- Cromo

Cu- Cobre

etOH- Etanol

Fe- Ferro

K- Potássio

Mg- Magnésio

Mn- Manganês

Mo- Molibidênio

Na- Sódio

Ni- Níquel

P- Fósforo

Pb- Chumbo

pH- Potencial hidrogeniônico

Sb- Antimônio

Se- Selênio

Si- Silício

Sn- Estanho

Sr- Estrôncio

V- Vanádio

Zn- Zinco

HNO_3 : Ácido nítrico

H_2O_2 : Peróxido de Hidrogênio

MetOH: Metanol

Hex: hexano

CH₂Cl₂: Diclorometano

μL: microlitro

H₂O: água

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
2 REVISÃO DE LITERATURA	28
2.1 A meliponicultura	28
2.1.1 A abelha mandaçaia (<i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i>)	30
2.2 Mercado da própolis	35
2.2.1 Patentes	36
2.3 A própolis/ geoprópolis	39
2.3.1 Composição química e atividades biológicas da própolis e geoprópolis	40
2.3.2 Compostos fenólicos	46
2.3.3 Importância farmacológica da geoprópolis	48
2.4 Atividade antimicrobiana	50
2.5 Sistemas de carreamento	51
2.5.1 Lipossomas	52
2.5.1.1 Microemulsão transdérmica PLO (Pluronic® Lecithin Organogel)	55
2.5.2 Bases galênicas	56
2.6 A pele	61
2.7 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	65
2.8 Espectrometria de emissão óptica de plasma acoplada indutivamente (IOES)	66
2.9 Análise estatística (quimiometria)	68
3 MATERIAIS E MÉTODOS	69
3.1 Coleta das amostras da geoprópolis	70
3.2 Controle microbiológico da geoprópolis	71
3.2.1 Retirada da unidade analítica	71
3.2.2 Homogeneização da unidade analítica	72
3.2.3 Diluições seriadas decimais	72
3.2.4 Determinação do número mais provável (NMP) de <i>coliformes</i>	72
3.2.5 Contagem de <i>Bacillus cereus</i>	73
3.2.6 Contagem de clostrídios sulfito redutores	73
3.2.7 Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.	74
3.2.8 Contagem de <i>Staphylococcus coagulase</i> positiva	75
3.2.9 Contagem de bolores / leveduras e bactérias aeróbias mesófilas	75
3.3. Preparo do extrato e partição química	76
3.3.1 Preparação do extrato etanólico da geoprópolis	76
3.3.2 Partições hexânica e diclorometânica	77
3.4 Método cromatográfico	78

3.4.1 Padrões e reagentes	78
3.4.2 Corrida cromatográfica e obtenção dos espectros	78
3.5 Determinação de multielementos na geoprópolis	79
3.5.1 Reagentes e soluções	79
3.5.2 Instrumentação	80
3.5.3 Procedimento de digestão	81
3.5.4 Determinação do carbono residual das digestões	82
3.5.5 Validação analítica	82
3.6 Determinação da atividade antioxidante total pela captura do radical livre DPPH	83
3.7 Fenólicos totais	83
3.8 Determinação de Flavonoides totais	84
3.9 Atividade antimicrobiana	85
3.9.1 Preparo e obtenção do inóculo microbiano	85
3.9.2 Antibiograma	86
3.9.3 Teste de microdiluição em caldo	87
3.10 Formulação piloto do pluronic lecithin organogel (PLO) à base do EEGP 5%	89
3.11 Formulação do creme à base do extrato hidroalcolico da geoprópolis	91
3.11.1 Embalagem e armazenamento da formulação	93
3.11.2 Teste de estabilidade acelerada	93
3.11.3 Centrífuga	93
3.11.4 Gelo e degelo	93
3.11.5 Estufa	94
3.11.6 pH	94
3.11.7 Espalhabilidade	94
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	95
4.1 Prospecção de Patentes	95
4.2 Análise microbiológica	107
4.3 Desempenho analítico	117
4.3.1 Determinação de multielementos na geoprópolis	118
4.4 Produção de extratos	139
4.5 Perfil químico	142
4.6 Potencial antioxidante, fenólicos totais e flavonoides	154
4.6.1 Análise estatística	164
4.7 Atividade antimicrobiana	165
4.8 Microorganismos X substâncias identificadas	173
4.9 Formulação do Pluronic Lecithin Organogel (PLO) à base do EEGP 5%	177

4.9.1 Potencial antioxidante do piloto (PLO – EEGP 5%)	182
4.10 Formulação semissólida (creme) e testes de estabilidade	187
4.10.1 Centrífuga	188
4.10.2 Gelo e degelo	189
4.10.3 Estufa	190
4.10.4 pH	190
4.10.5 Espalhabilidade	192
5 CONCLUSÕES	197
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	200
REFERÊNCIAS	202
APÊNDICE A	227
APÊNDICE B	228
APÊNDICE C	229
APÊNDICE D	230
APÊNDICE E	231
APÊNDICE F	232
APÊNDICE G	233
APÊNDICE H	234
APÊNDICE I	235
APÊNDICE J	236
APÊNDICE K	237
APÊNDICE L	238
APÊNDICE M	239
APÊNDICE N	240
APÊNDICE O	242
APÊNDICE P	243
APÊNDICE Q	244
APÊNDICE R	245
APÊNDICE S	246
APÊNDICE T	247
APÊNDICE U	249
APÊNDICE V	251
APÊNDICE W	252

RESUMO

A *Melipona quadrifasciata anthidioides* é uma espécie de abelha sem ferrão conhecida popularmente no Brasil como "mandaçaia". Produtos derivados de abelhas para uso alimentar e terapêutico têm estimulado a avaliação da composição da geoprópolis. Com o objetivo de caracterizar a geoprópolis bruta da mandaçaia, e avaliar a estabilidade física de uma formulação semissólida do tipo creme incorporada de ativos dessa geoprópolis. Amostras deste produto foram fornecidas pelo meliponário do Centro de Agroecologia Rio Seco (CEARIS), localizado na cidade de Amélia Rodrigues-BA (UEFS), (latitude 12°23'08" S / longitude 38°47'51" W. Os experimentos foram realizados nos laboratórios: (LAEX-UEFS), (LABIV-UEFS), (IGEO UFBA), (LABMICRO-UFBA) (LAMABI/ICS/UFBA), (LAPEMEC) UFBA). Inicialmente realizou-se uma prospecção de patentes com o termo "própolis" e "geoprópolis". Posteriormente avaliou-se a microbiota presente na geoprópolis além da quantificação de macro e microelementos da matéria-prima bruta através de IOES. Os extratos utilizados foram preparados através da técnica de extração utilizando-se 5g da geoprópolis diluído em 50ml com etanol a 96°GL, e em seguida realizou-se análise do perfil químico utilizando-se da técnica de HPLC. Além das avaliações de seu potencial antioxidante e atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli* (gram-negativa) e *Staphylococcus aureus* (Gram positiva). A formulação elaborada foi submetida a testes de estabilidade acelerada preconizada pela ANVISA. Testes de espalhamento *in vitro* também foram aplicados, de forma delinear o desempenho na qualidade de um produto com potencial para aplicação tópica. A prospecção patentária mostrou apenas 3 depósitos com o termo "geoprópolis". Os resultados da microbiota da geoprópolis *in natura* demonstraram que os valores quantitativos de microrganismos indicadores dos critérios microbiológicos utilizados para alimentos foram positivos para *Bacillus cereus*, *Bactérias aeróbias mesófilas* e bolores e leveduras. Com ausência de *Salmonella sp.* e *Clostridium sulfito redutor*. Foram quantificados os macro e microelementos (mg/kg) (Al 320414,40-36911,1) (As <LD -4,37) (Ba 38,36-211,11) (Cd <LD) (Co <LD- 14,12) (Cr 17,41-38,07) (Cu 10,63-28,73) (Fe 21973,96- 11536,47) (Mn 50,51- 310,51) (Mo <LO) (Ni 2,28-21,74) (Pb 3,45-8,55) (Sb <LD-1,64) (Se <LD-1,01) (Si <LD- 150,77) (Sn 4,92-16,14) (Sr 9,21-36,29) (V 28,77-78,73) (Zn 24,34-50,31) (Ca 672,38-94527) (K 1974,38-9198,91) (Mg 1961,17-7481,79) (Na 154,55-340,46) (P 16,59-51,07) além do C (2,26-7,69%). Os extratos apresentaram compostos fenólicos e flavonoides além de exibirem potencial antioxidante. No perfil químico foram identificados: o ácido gálico, naringenina, kampferol e o kaempferide. O produto formulado com (2,5%) do extrato apresentou a melhor estabilidade frente às condições de estresse testadas. Sua capacidade de incorporação e a compatibilidade do extrato etanólico da geoprópolis foi significativa, mantendo inalteradas as características dos testes de estabilidade. Estes resultados agregam valor à geoprópolis.

Palavras-chave: *Melipona quadrifasciata anthidioides*, geoprópolis, multielementos, IOES, HPLC.

ABSTRACT

Melipona quadrifasciata anthidioides is a species of stingless bee popularly known in Brazil as "mandaçaia". Products derived from bees for food and therapeutic uses, have stimulated the evaluation of the composition of geopropolis. In order to characterize the gross geopropolis mandaçaia, and to evaluate the physical stability of a semi-solid cream-type formulation incorporated into the assets of this geopropolis. Samples of this product were provided by the meliponary of the Rio Seco Agroecology Center (CEARIS), located in the city of Amélia Rodrigues-BA (UEFS), (latitude 12 ° 23'08 " S / longitude 38 ° 47'51 " W. The experiments were carried out in the laboratories: (LAEX-UEFS), (LABIV – UEFS), (IGEO UFBA), (LABMICRO-UFBA) (LAMABI / ICS / UFBA), (LAPEMEC) UFBA). Initially, a patent prospecting with the term "propolis" and "geopropolis" was carried out. Subsequently, the microbiota present in the geopropolis was verified in addition to the quantification of macro and microelements of the raw material through IOES. The extracts used were prepared using the extraction technique using 5g of geopropolis diluted in 50ml with alcohol at 96 ° GL, then an analysis of the chemical profile was performed using the HPLC technique in addition to evaluations of its antioxidant potential and antimicrobial activity against *Escherichia coli* (gram negative) and *Staphylococcus aureus* (gram positive). The elaborated formulation was subjected to accelerated stability tests recommended by ANVISA. In vitro spread tests were also applied in order to outline the quality performance of a product with potential for topical application. Patent prospecting showed only 3 deposits with the term "geopropolis". The results of the microbiota of the geoprópolis in natura demonstrated that the quantitative values of microorganisms indicating the microbiological criteria used for food were positive for *Bacillus cereus*, aerobic mesophilic bacteria and molds and yeasts. With the absence of *Salmonella sp.* and Clostridium sulfite reducer. Macro and microelements (mg/ kg) were quantified (Al 320414,40-36911,1) (As <LD -4,37) (Ba 38,36-211,11) (Cd <LD) (Co <LD- 14,12) (Cr 17,41-38,07) (Cu 10,63-28,73) (Fe 21973,96- 11536,47) (Mn 50,51- 310,51) (Mo <LO) (Ni 2,28-21,74) (Pb 3,45-8,55) (Sb <LD-1,64) (Se <LD-1,01) (Si <LD- 150,77) (Sn 4,92-16,14) (Sr 9,21-36,29) (V 28,77-78,73) (Zn 24,34-50,31) (Ca 672,38-94527) (K 1974,38-9198,91) (Mg 1961,17-7481,79) (Na 154,55-340,46) (P 16,59-51,07) beyond C (2,26-7,69%). These extracts showed phenolic compounds and flavonoids in addition to exhibiting antioxidant potential. The analysis of the chemical profile allowed to identify: gallic acid, naringenin, kampferol and kaempferide. The product formulated with (2.5%) of the extract has the best stability under the stress conditions tested. Its ability to incorporate and accept the geopropolis ethanol extract was significant, keeping the characteristics of the stability tests unchanged. These results add value to geopropolis.

Keywords: *Melipona quadrifasciata anthidioides*, geoprópolis, multi-elements, IOES, HPLC

1 INTRODUÇÃO

A própolis é uma substância resinosa naturalmente produzida por abelhas a partir da seiva de plantas, muito utilizada em produtos farmacêuticos como insumo ativo, além de apresentar potencial aplicação como componente em alimentos funcionais. A abelha mandaçaia (*Melipona quadrifasciata anthidioides*) utiliza essa resina misturada com barro para proteger a entrada das colônias, sendo essa mistura denominada de geoprópolis. A aplicação dessa combinação como um ativo em formulações é limitada pela falta de conhecimento e de um Padrão de Identidade e Qualidade (PIQ) deste produto, além da falta de informações sobre as características físico-químicas e suas propriedades biológicas.

O desenvolvimento de cosméticos, medicamentos a partir de produtos naturais é um advento da sociedade moderna que busca por novas fontes de tratamento para diversas enfermidades. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), este mercado é responsável por movimentar cerca de 83 bilhões de dólares a cada ano, com a estimativa de que 70 a 95% da população dos países em desenvolvimento faça uso dos mesmos como alternativa terapêutica (ROSA, CÂMARA e BÉRIA, 2011).

Para Silva et al (2010), existem diversos medicamentos, formas farmacêuticas e sistemas terapêuticos no mercado que podem ser utilizados para administração cutânea. As recentes inovações nestas áreas têm como objetivo melhorar ou contornar desvantagens associadas às formulações convencionais.

O Brasil é reconhecido na comunidade internacional pela sua diversidade de espécies vegetais, animais, e notadamente genética. Apresenta um enorme potencial para consolidarem-se através do desenvolvimento de novos produtos a partir da meliponicultura.

Esta espécie de abelha (*Melipona quadrifasciata anthidioides*) merece destaque especial pelo fato de ser pouco estudada e, também, por contribuir na polinização da maioria das espécies vegetais nordestinas. Por fornecer os subprodutos (mel, pólen e geoprópolis) consagra a mão-de-obra familiar, gera

renda e fixa o homem no campo, além de aproveitar o potencial da vegetação da caatinga no semiárido a criação de abelhas sem ferrão é uma atividade emergente no Nordeste do Brasil.

Nos últimos anos, a própolis de regiões tropicais, especialmente do Brasil, tem sido alvo de grande interesse econômico de países como os Estados Unidos da América (EUA), China e Japão; sendo que o Japão atualmente é o maior comprador mundial deste produto brasileiro (MARCUCCI, CUSTÓDIO e PEREIRA, 2007).

Esse fator economicamente importante levou muitos pesquisadores, principalmente os japoneses, a investigar a própolis brasileira. Atualmente, encontra-se na literatura internacional um número considerável de artigos científicos tratando deste produto brasileiro, conforme afirma Marcucci, Custódio e Pereira (2007). No caso da geoprópolis, poucos ainda são os estudos para este tipo específico de própolis.

O Brasil ocupa a terceira posição na produção mundial de própolis com aproximadamente 150 toneladas por ano. A maior parte disso é destinada à exportação, sendo o Japão o principal importador de acordo com o (SEBRAE-BA, 2017). De toda própolis *in natura* consumida no Japão, 92% são de origem brasileira, onde o extrato etanólico da substância é vendido a U\$110 no frasco com aproximadamente 30ml, conforme os dados da Japan Trade Organization. Contudo, em relação a geoprópolis, poucos ainda são os estudos para este tipo específico de própolis.

É válido observar que o manejo de abelhas sem ferrão, denominadas melíponas, é uma atividade valiosa do ponto de vista social, ambiental e econômico; porém, ainda não é tradicional no Brasil, em decorrência do desconhecimento, por parte dos apicultores/meliponicultores e consumidores, a cerca da importância de seus produtos.

Nesse contexto, vem à tona o protocolo de Nagoya que, diante de acordos internacionais, traça os objetivos para o combate à chamada 'biopirataria'; para incentivar a biotecnologia e a bioeconomia; a defesa dos direitos de povos

originários e tradicionais quanto aos seus conhecimentos tradicionais associados (CTA) e o respeito à soberania nacional em negociações internacionais (RESK, 2020). Além de favorecer depósitos de patentes a partir de insumos da biodiversidade brasileira.

Essas abelhas apresentam grande potencial na produção da geoprópolis, especialmente devido a sua capacidade de adaptação (SEBRAE-BA, 2017) e devido ao maior estresse hídrico das espécies vegetais do semiárido nordestino, a concentração de compostos a concentração de compostos fenólicos antioxidantes em suas espécies vegetais seja mais abundante, haja vista que o estresse hídrico é comprovadamente um fator que contribui para que a planta aumente a síntese destes constituintes (COIMBRA, 2019).

Observa-se que o Nordeste brasileiro possui grande potencial melípona frente a outras regiões do país e até mesmo a outros países, se destacando além do mel, geoprópolis, pólen e cera. O fato de a atividade melípona aproveitar as características locais como: vegetação nativa diversificada, com pouca necessidade de água, e florada o ano todo, permite a expansão de novos mercados (SILVA, PEREIRA, *et al.*, 2012).

Dados apontam que o cenário de crescimento com rapidez e a magnitude econômica da atividade melípona elevou significativamente a sua importância socioeconômica, estimulando os governos estaduais e o governo federal, a demonstrar preocupação em apoiar esta atividade e seus integrantes, por intermédio de várias políticas públicas nesta área (SEBRAE, 2017). O Banco do Nordeste já demonstrou interesse frente à certificação dos produtos das abelhas nativas brasileiras, e ressalta a importância da realização de pesquisas voltadas para outros produtos destas abelhas que não o mel.

Desta forma, a meliponicultura surge como uma das poucas atividades agropecuárias que atende aos quatro eixos da sustentabilidade: é causadora de impacto ambiental positivo, economicamente viável, socialmente aceita e culturalmente importante no convívio com a sociedade. Nessa configuração, gera-se renda para o meliponicultor, ocupa mão de obra familiar ou contratada e,

desta forma, ajuda a diminuir o êxodo rural, além de contribuir para a preservação da flora nativa, pois não se desmata para criar estes insetos (SOUZA, 2017).

Ainda citando o estudo de mercado realizado pelo SEBRAE (2017), verifica-se o elenco das forças e oportunidades da produção da própolis na Bahia; que possui diversos benefícios medicinais o qual auxiliam na divulgação do produto. Sua produção é favorável no estado; o mercado farmacêutico continua realizando pesquisas por meio de suas propriedades medicinais. Existe busca crescente por produtos naturais que proporcionem benefícios à saúde humana, por isso são necessárias novas técnicas e tecnologias produtivas a fim de suprir a demanda.

As pesquisas que examinam a composição química e as propriedades terapêuticas dos produtos naturais produzidos por essa subespécie (*Melipona q. anthidioides*) como mel e o geoprópolis, ainda são escassos (SANTOS, J. F. C., et al., 2017).

Os estudos de algumas geoprópolis produzidas pelas abelhas melíponas revelaram a presença de benzofenonas preniladas, compostos fenólicos (BANKOVA, CASTRO e MARCUCCI, 2000); (SOUZA, CAMARA e SILVA, 2013); (DUTRA, ABREU e CUNHA, 2014) di e triterpenos, e ácido gálico (VELIKOVA et al., 2000). Além disso, as amostras de geoprópolis exibiram atividade antimicrobiana, bem como propriedades antioxidantes (SOUZA, CAMARA e SILVA, 2013); (DUTRA, ABREU e CUNHA, 2014), anti-inflamatórias, anti-proliferativos e antinociceptivas (CUNHA e FRANCHIN, 2016). As propriedades antioxidantes da geoprópolis, devido à sua alta concentração em fenóis e outros compostos antioxidantes (SOUZA et al., 2014; DUTRA et al., 2014), respalda seu uso na prevenção de doenças degenerativas crônicas.

Nesse sentido, a caracterização da microbiota da geoprópolis *in natura*, a produção dos diferentes extratos, determinação do perfil químico: quantificação de compostos fenólicos, flavonoides, análise de suas atividades antioxidantes e antimicrobianas, análise dos macro e microelementos com potencialidade tóxica, são fundamentais para definir as características e qualidade da matéria prima em questão, ao mesmo tempo em que pretende situar Padrões de Identidade e

Qualidade (PIQ) a serem utilizados como base à elaboração de legislação específica para este tipo de produto.

Pode-se dizer que o Brasil, como um dos maiores produtores de própolis do mundo (PINTO, 2011) ainda carece de pesquisas que explorem e elucidem possíveis aplicações da geoprópolis, sendo necessário o desenvolvimento de estudos que relacionem sua composição química com a atividade biológica. Dessa maneira seria possível correlacionar o tipo da geoprópolis com a sua aplicação.

O uso de ativos da biodiversidade brasileira, aliado à preocupação estética visando uma aparência jovem, tem motivado a pesquisa e o desenvolvimento de novas formulações cosméticas que apresentem segurança, eficácia e estabilidade confiável (FIGUEIREDO, 2014).

Um das tendências do mercado e da Ciência Cosmética é o desenvolvimento de produtos com maior número de componentes de origem natural, especialmente os de origem vegetal, explorando de forma racional a biodiversidade brasileira. Estes produtos têm despertado muito interesse pelo mercado internacional, principalmente se a matéria prima apresenta estudos científicos comprovando a segurança e eficácia, além do comprometimento com o desenvolvimento sustentável (VIOLANTE, SOUZA, *et al.*, 2009).

Assim, uma formulação semissólida, em que suas propriedades de estabilidade e pH estejam de acordo com as normas de registro ANVISA, somado a incorporação do extrato da geoprópolis da *Melipona quadrifasciata anthidiodes* que apresenta componentes bioativos (compostos fenólicos, flavonoides) com propriedades antioxidantes e atividade comprovada frente a microorganismos responsáveis por causar enfermidades na pele, parece ser um promissor e inovador produto com potencial uso farmacêutico para o tratamento adjuvante nesse sentido.

Este trabalho pretende identificar características próprias deste produto (geoprópolis) das melíponas que exprima nele homogeneidade de produção e identificação de procedência, além de atribuir e consolidar características

benéficas tanto do ponto de vista alimentar quanto do farmacêutico. Alguns estudos já relataram as propriedades antimicrobiana, além de propriedades antioxidantes de muitos constituintes químicos da geoprópolis; assim, estes ativos podem ser utilizados como alternativa à antibioticoterapia convencional e figurar como terapia complementar para infecções de pele e cicatrizante.

Objetivo Geral

Avaliar a geoprópolis bruta da *Melipona quadrifasciata anthidioides* e desenvolver uma formulação semisólida (creme) à base do extrato desta geoprópolis, com a finalidade de agregar valor a este produto das abelhas sem ferrão.

Objetivos específicos:

- Realizar uma prospecção de patentes com os termos “própolis” “geoprópolis”;
- Caracterizar e quantificar a microbiota da geoprópolis *in natura*;
- Caracterizar e quantificar os macros e microelementos com potencialidade tóxica da geoprópolis *in natura*; *Escherichia coli*.
- Determinar do perfil químico: identificar e quantificar compostos fenólicos e flavonoides;
- Testar as atividades antioxidantes dos extratos;
- Avaliar a atividade antimicrobiana do extrato etanólico da geoprópolis, frente a uma bactéria Gram-negativa: *Escherichia coli* e uma Gram positiva: *Staphylococcus aureus*;
- Testar a incorporação do extrato etanólico da geoprópolis da *Melipona quadrifasciata anthidioides*; em uma formulação piloto utilizando o Pluronic Lecitin Organogel (PLO).
- Elaborar um creme à base do extrato etanólico da geoprópolis da *Melipona quadrifasciata anthidioides* e realizar os testes de estabilidade acelerada preconizados pela ANVISA na formulação estabelecida.

REVISÃO DE LITERATURA

Neste capítulo serão discutidas matérias que atravessam a temática abordada no estudo, sendo importante registrar que a revisão de literatura foi estruturada, levando-se em conta os estudos de autores renomados da área em questão, que contribuem significativamente para a construção da revisão de literatura. Registra-se que também, serão apresentados os dados levantados em algumas instituições brasileiras acerca do tema em pauta.

2.1 A meliponicultura

Os meliponíneos, ou abelhas indígenas sem ferrão, são abelhas pantropicais (ocorrem somente nas regiões tropicais e subtropicais) e eusociais (vivem em colônias permanentes com divisões de castas). No Brasil, estima-se que a fauna de abelhas seja de 3000 espécies, dessas, cerca de 300 são abelhas sem ferrão sociais conforme (SILVEIRA, R. e ALMEIDA, 2002)(OLIVEIRA, SARAIVANUNOMURA, *et al.*, 2014).

Segundo Pinaro (2007), as “abelhas sem ferrão” (ASF) pertencem ao reino Animalia Filo Arthropoda; Classe Insecta; Ordem Hymenoptera; Subordem Aprocrita; Superfamília Apoidea; Família Apidae; Subfamília Meliponinae; Tribo Meliponini, e são popularmente conhecidas como ASF, pois, possuem seu acúleo (ferrão) atrofiado (NOGUEIRA-NETO, 1997).

Estudos indicam que, na América Central e do Sul, essas abelhas foram intensamente cultivadas no passado, sendo os Maias, dentre as culturas indígenas mesoamericanas, os principais detentores do conhecimento acerca da criação de ASF (SILVA, 2005).

Os meliponíneos eram as únicas abelhas produtoras de mel empregadas até 1838, antes da introdução da abelha europeia (KERR et al, 2005). A sua criação constitui a Meliponicultura (NOGUEIRA-NETO, 1953). Por ser tradicionalmente manejada por povos indígenas, também é chamada de “abelha indígena” (LOPES, 2005). No Brasil, os Kayapó representam um dos grupos indígenas que demonstraram, em passado recente, bom conhecimento referente ao manejo de abelhas sem ferrão e seu comportamento (SILVA, 2005).

A região do país onde a meliponicultura é mais praticada é a Nordeste. São encontrados meliponicultores com até 1.500 colmeias e que sobrevivem apenas do comércio de mel. As principais espécies criadas por eles são: *Melipona compressipes fasciculata* Smith, *Melipona scutellaris* Lep. e *Melipona subnitida* (AIDAR, 1996).

No Brasil, o manejo de abelhas nativas, assim como de qualquer outro animal silvestre, dispõe de legislação específica, a Resolução CONAMA nº 346, que disciplina a utilização das abelhas nativas e a implantação de meliponários (Figura 1) ponderando o valor da meliponicultura no âmbito econômico, social e ambiental (BRASIL, 2004).



Figura 1: Meliponário (modelo de criação de abelhas sem ferrão). Fonte, Disponível em <<https://parqueecologicoimigrantes.org.br/meliponario-uma-questao-de-vida/>>

Os produtores rurais nordestinos utilizam a meliponicultura como uma atividade alternativa de renda, tendo em vista as dificuldades de obter uma agricultura rentável numa região que apresenta escassez de chuvas (MARINHO et al, 2002). Esta atividade possibilita melhoria na qualidade de vida devido à exploração racional de seus produtos (MODRO, 2006), além de aumentar a produção agrícola e contribuir para a manutenção e preservação de espécies vegetais por meio do processo de polinização (WILLIAMS, OSBORNE, 2002).

2.1.1 A abelha mandaçaia (*Melipona quadrifasciata anthidioides*)

“Mandaçaia” é uma palavra indígena que significa “vigia bonito”, que deriva da possibilidade de se observar, no orifício de entrada da colméia, uma abelha sempre presente, com a função de proteger o ninho contra a entrada de invasores. A entrada da colméia da mandaçaia caracteriza a espécie. É formado por um orifício que permite a passagem de apenas uma campeira por vez, envolto por uma estrutura composta por raios concêntricos, construído com geoprópolis, uma mistura de barro e resinas extraídas das plantas (Figura 2).



Figura 2: Detalhe da abelha mandaçaia vigia, na entrada da colônia. Fonte: Disponível em <https://i1.wp.com/www.criarabelhas.com.br/wp-content/uploads/2018/05/Manda%C3%A7aia-Vigia.jpg?w=367&ssl=1>

Entre as espécies de abelhas sem ferrão, a *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Apidae; Meliponini), popularmente conhecida como mandaçaia, amanaçaí, amanaçaia, manaçaia, mandaçaia-grande, abelha nativa, abelha mansa ou abelha indígena, é encontrada em grande parte do território brasileiro, e sua distribuição geográfica está associada a regiões que estejam 500 metros acima do nível do mar. Entretanto, alguns estados da região Nordeste já estão apresentando a produção de tais abelhas (BATALHA-FILHO *et al.* 2009).

A *Melipona quadrifasciata anthidioides* esta distribuída em quase todo o Brasil. No Nordeste tem registros de ocorrência em Alagoas, Bahia, Paraíba, Pernambuco, Sergipe e em outras regiões no Espírito Santo, Goiás, Mato grosso do Sul, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo (Figura 3).



Figura 3: Distribuição geográfica da ocorrência da *Melipona quadrifasciata anthidioides* (mandaçaia) no Brasil. Fonte: Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=2tT_o10alZo>19.09.2020 15:59h

Esta espécie tem o costume de construir seus ninhos emocos de árvores do umbuzeiro (*Spondias tuberosa*), licurizeiro (*Syagrus coronata*) e imburana (*Amburana cearensis*) (Figura 4).



Figura 4: Colônia de mandaçaia em cortiços e em tronco de imburana. Disponível em https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/bioma_caatinga/arvore/CONT000g5twggzg02wx5ok01edq5s5hfa3sp.html 19.06.2020 15:59h

As abelhas mandaçaia desempenham um importante papel ecológico, contribuindo para a preservação das espécies vegetais através da polinização sendo responsáveis por até 90% da polinização das árvores nativas (Figura 5) (KERR, CARVALHO e NASCIMENTO, 1996).



Figura 5: Abelha sem ferrão *Melipona quadrifasciata anthidioides* coletando resinas, néctar e ou pólen. Fonte: Disponível em <https://www.cpt.com.br/artigos/abelhas-sem-ferrao-mandacaia-melipona-mandacaia>.

Estas abelhas adicionam à resina coletada nas plantas, terra ou argila (Figura 6) empregando-a também no isolamento térmico e contra inimigos, recobrando a parede da colmeia, reforçando os favos no preparo nos locais assépticos para a postura da abelha rainha. Esta é uma característica exclusiva do gênero *Melipona*. Tratam-se de abelhas sociais que, quando em colônias fortes, apresentam o comportamento de voar sobre as pessoas, esbarrando na pele, mas raramente beliscam. Seus ninhos são encontrados em ocos de árvores (NOGUEIRA-NETO, 1970). As colônias apresentam de 300 a 400 abelhas.



Figura 6: Abelha sem ferrão *Melipona quadrifasciata anthidioides* coletando mistura de areia e argila para produção da geoprópolis fonte:Fabiano Zacarias, Fonte: disponível em <https://www.youtube.com/watch?v=n-1gkyr76yi>

(LINDAUER e KERR, 1960).

A mandaia é subdividida em duas subespécies, *M. quadrifasciata quadrifasciata* e *M. quadrifasciata anthidioides* (Figura 7a), as quais são bem descritas na literatura no que se refere ao desenvolvimento e diversidade genética. Contudo, estudos sobre a composição química, e propriedades terapêuticas dos produtos naturais produzidos por essas subespécies, tais como mel, e geoprópolis permanecem escassos (SANTOS, J. F. C., *et al.*, 2017). Esta

abelha brasileira mede entre 10 e 11 mm de comprimento, tem cabeça e tórax pretos, abdome com faixas amarelas interrompidas no meio de cada segmento e asas ferrugíneas. A subespécie sem ferrão *Melipona quadrifasciata anthidioides* se diferencia das demais por possuírem 6 tergitos abdominais interrompidos.

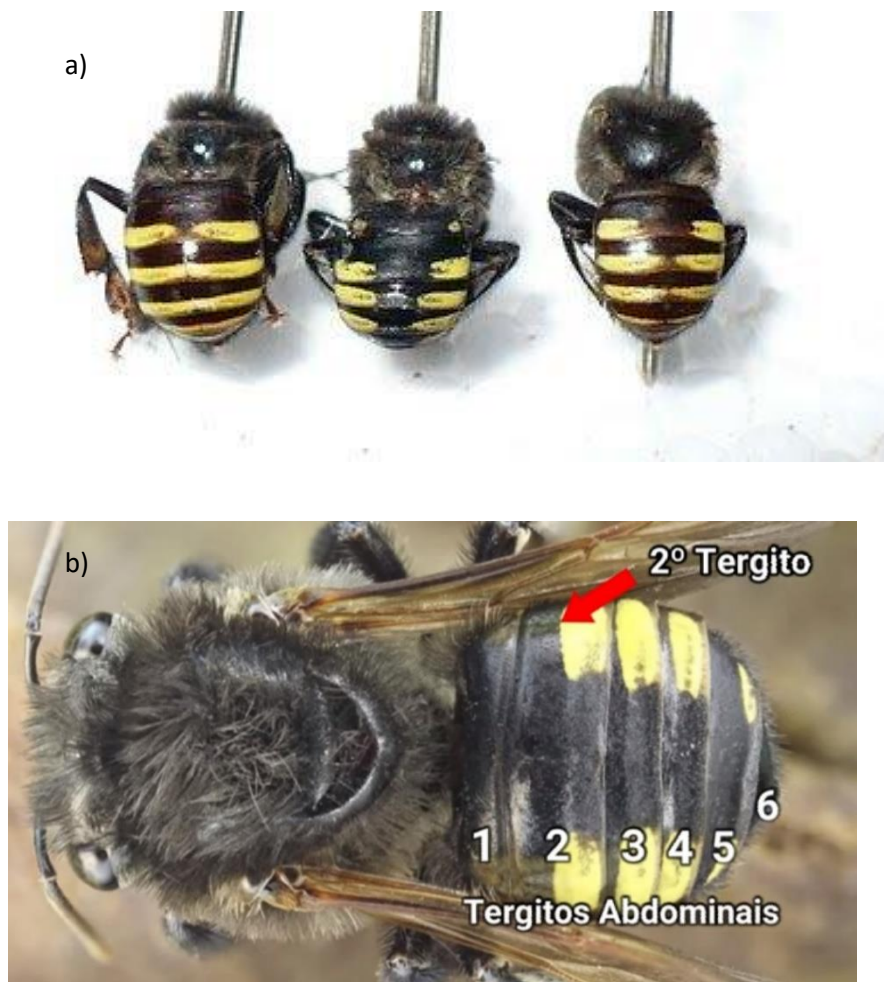


Figura 7: a) *Melipona quadrifasciata quadrifasciata*, *Melipona quadrifasciata anthidioides* e uma espécie híbrida, da esquerda para direita, b) detalhe dos tergitos abdominais da *M. quadrifasciata anthidioides*. Fonte: disponível em <https://www.youtube.com/watch?v>

(Figura 7b).

Entretanto, muitas delas estão seriamente ameaçadas de extinção em consequência das alterações de seus ambientes, causados principalmente pelo desmatamento, uso indiscriminado de agrotóxicos e pela ação predatória de meliívoros (KERR, CARVALHO e NASCIMENTO, 1996). Estas práticas têm se tornado comum em diversas regiões do Brasil, inclusive na região Nordeste.

As mudanças sócioecológicas no território Piemonte da Diamantina, a exemplo da expansão agrícola e urbana provocando as derrubadas e queimadas

da Caatinga, associadas às mudanças climáticas que resulta em longas estiagens, assim como o uso desordenado de agrotóxico no campo, colocou a abelha mandaçaia em uma posição de ameaça de extinção na região.

O alcance do raio de ação das abelhas campeiras indica o quão longe podem voar para coletar alimento e outros componentes. Esta distância é específica para cada espécie (AIDAR e ROSSINE, 2002) e se torna importante à medida que o raio de ação entorno do meliponário informa quanto aos recursos disponíveis para elas (NOGUEIRA-NETO, 1997).

Observa-se que dois quilômetros (2km) é a distância máxima do raio de alcance de vôo frequentemente relatada na literatura científica, mas as abelhas sem ferrão podem voar mais do que essa extensão se necessário (KUNHN-NETO e CASTRO, 2009).

Economicamente, quanto mais próximas estiverem as flores, melhor, pois as abelhas consumirão menos mel durante a atividade da coleta. Algumas espécies de abelhas sem ferrão como a *Melipona mandacaia*, conseguem forragear em seu habitat nativo a distâncias de aproximadamente 2,1 km (KUNHN-NETO e CASTRO, 2009).

Ao longo do tempo os produtos das abelhas foram perdendo sua importância e atualmente esses produtos apresentam apenas um papel secundário na medicina ocidental moderna. Contudo, as pessoas que vivem em países orientais, em desenvolvimento e/ou seguidores de abordagens consideradas holísticas, ainda usam os produtos das abelhas em larga escala (MÜNSTEDT e BOGDANOV, 2009).

Conservar a abelha mandaçaia garante o acesso à geoprópolis além de preservar as técnicas e conhecimentos locais, mantém o equilíbrio do ecossistema ao garantir alimentos através da polinização das plantas. A utilização da geoprópolis destas abelhas sem ferrão apontam este subproduto da colônia como uma matéria-prima sustentável passível de valor agregado.

2.2 Mercado da própolis

De acordo com o cenário mundial da própolis, o Brasil ocupa a terceira posição, com uma produção aproximada de 150 toneladas por ano. Atualmente, o Japão é o maior consumidor da própolis brasileira: cerca de 92% de todo própolis utilizado no Japão advém do Brasil (SEBRAE-BA, 2017).

Grande parte da produção brasileira de própolis é voltada para o mercado externo (2/3 da produção); em parte, isso se deve à desvalorização da moeda brasileira, o que levou ao aumento da demanda e do lucro deste segmento (SEBRAE-BA, 2017). Em uma comparação ampla, espera-se que apenas a própolis receba uma receita de US \$ 700 milhões até 2024, com uma taxa de crescimento de 6% durante o período de 2019-2024 (MARKET RESEARCH FUTURE, 2020).

No sul da Bahia existem programas de incentivo para a produção e desenvolvimento da própolis vermelha. Essa região abriga grande quantidade de manguezais que são os locais de repasto para as abelhas que produzem tal própolis. Esta conjuntura faculta aos produtores a organização em cooperativas ou associações que os assistam com intuito de capacitá-los no sentido de atender a demanda de exportação (SEBRAE-BA, 2017).

O Brasil é um participante importante nesse mercado, não apenas por sua produtividade, mas também pela qualidade da própolis derivada de uma flora com grande biodiversidade e com ausência de metais potencialmente tóxicos.

Convém ressaltar que a produção de abelhas sem ferrão, denominadas melíponas, no estado da Bahia, Figura como boa oportunidade, tendo em vista sua produtividade e diversidade química da geoprópolis (BANKOVA V, 2000); (SEBRAE-BA, 2017). A meliponicultura cresceu bastante nos últimos anos devido ao investimento em pesquisa, melhoramento das técnicas de manejo, difusão do conhecimento e pelo aumento no interesse pela polinização agrícola (CORTOPASSI-LAURINO e NOGUEIRA NETO, 2006).

Diante das fortes tendências de competitividade e empreendedorismo resultantes do processo de globalização, a busca por inovação científica e tecnológica é imperativa atualmente. A procura pelo inovador exige antecipação, análise das tendências e ousadia.

Por fim, futuros trabalhos com a geoprópolis da *M. q anthidioides* através da confirmação deste produto enquanto matéria-prima possuir padrões de identidade e qualidade além dos ativos específicos desta matriz apresentarem atividades biológicas podem explorar a aplicação das patentes em produtos e marcas específicas como exploração de novas oportunidades neste nicho de mercado.

2.2.1 Prospecção Tecnológica

Segundo Mayerhoff (2008) os estudos de prospecção tecnológica auxiliam na tomada de decisão e delineamento das escolhas potencialmente exitosas representando, dessa forma, uma ferramenta básica no processo de avaliar o panorama mundial e nortear as perspectivas futuras.

Um recurso particularmente útil no rastreamento tecnológico consiste na consulta de bancos de depósito de patentes que disponibilizam informações a respeito do estado da arte em relação ao seu conteúdo, processos, produtos, entre outros dados relevantes (AMPARO, RIBEIRO, *et al.*, 2012).

É pertinente salientar que a inovação não se refere exclusivamente a algo inédito, mas também a uma aplicabilidade nova de algo já existente, como explica o inciso IV do 2º parágrafo da lei 13.243/16, que conceitua inovação como a introdução de novidade ou aperfeiçoamento resultando em novos produtos, serviços ou processos ou que compreenda a agregação de novas funcionalidades ou características a produto, serviço ou processo já existente que possa resultar em melhorias e em efetivo ganho de qualidade ou desempenho.

Em 2010 A 10ª Conferência das Partes da Convenção sobre Diversidade Biológica estabeleceu, no Japão, o Protocolo de Nagoya, que regulamenta o Acesso a Recursos Genéticos e a Repartição Justa e Equitativa dos Benefícios Advindos de sua Utilização. Mas, somente em 12 de outubro de 2014, o

documento passou a vigorar de forma 'vinculante', após a ratificação nas legislações internas em mais da metade dos países signatários (51), que hoje chegam a 126. O Brasil ficou de fora nesta etapa, apesar do protagonismo na formulação. Só agora, em 2020, retomou o processo, neste hiato temporal (RESK, 2020).

A importância no mercado de patentes deste tratado ambiental multilateral é de estabelecer um sistema comercial global para investimento, pesquisa e desenvolvimento na composição genética e bioquímica dos organismos vivos (plantas, animais ou micro-organismos nativos). Vários especialistas definem o documento como uma janela de oportunidade para a expansão da chamada 'bioeconomia' baseada no respeito ao direito da soberania nacional, com regras mais claras na relação internacional. Muitos setores têm relação a este segmento. Entre eles, de alimentos e bebidas, cosméticos, medicina & saúde e agricultura. O protocolo prevê acordos bilaterais, em que o provedor deve autorizar o parceiro (externo) ao acesso (RESK, 2020).

Para se entender esta conjuntura, vale esclarecer que o Brasil tem uma importância fundamental ao mundo, por sua megadiversidade, e aprovou, somente em 2015, a Lei da Biodiversidade (13.123/2015), que, por sua vez, introduziu regras quanto ao patrimônio genético e o conhecimento tradicional. Assim reconhece que os países têm soberania sobre os recursos genéticos existentes em seu território, os quais possuem inquestionável valor, e podem exigir uma participação dos benefícios decorrentes de sua utilização pelos interessados, sejam eles um particular, uma empresa ou mesmo uma entidade governamental (RESK, 2020).

O protocolo de Nagoya estabelece que:

- os lucros de produção e a venda de produtos elaborados com recursos genéticos serão obrigatoriamente compartilhados com o país de origem. Isso pode acontecer por meio do pagamento de royalties, parcerias, transferência de tecnologias ou capacitação;

- reconhece expressamente o direito ao recebimento de benefícios para comunidades indígenas e locais detentoras de conhecimentos tradicionais que venham a ser utilizados por usuários.

- implica estímulo à criação de protocolos comunitários e do estabelecimento de requisitos mínimos e transparentes para a autorização de acesso a estes conhecimentos;

- obriga os países signatários a proporcionar segurança jurídica, clareza e transparência em sua legislação ou seus regulamentos nacionais de acesso e repartição de benefícios (RESK, 2020).

Nesse contexto, a geoprópolis das abelhas sem ferrão aparece como um bioproduto chave e inovador do ponto de vista de patentes.

Devido à diversidade de propriedades farmacológicas e uso nas indústrias de cosméticos, alimentícia, entre outras, aliada a grande aceitação no mercado, além da divulgação de inúmeros estudos científicos sobre a própolis, tem-se verificado o aumento do número de pedidos de patentes da própolis, fenômeno este que tem ocorrido em todos os continentes, merecendo especial atenção os países asiáticos, que possuem a maioria das patentes (SANTOS, 2008)

A própolis é um exemplo de produto que se mantém inovador pelas constantes descobertas em relação as suas propriedades biológicas apesar dos relatos de sua utilização desde a antiguidade e, atualmente, ainda representa uma opção popular de medicamento alternativo (SFORCIN e BANKOVA, 2011).

Segundo Nascimento (2018), a assimilação das patentes em própolis pode ser consideradas uma proxy de apropriabilidade de valor da inovação. Ao longo dos anos, a própolis tem se mostrado eficaz nas mais diversas áreas da medicina principalmente na área da odontologia.

Malerba & Orsenigo (2002) identificaram que a empresa Colgate-Palmolive detém a maior parte das patentes mundiais referentes à própolis, o que evidencia a vantagem da estrutura da grande empresa dentro da arquitetura da indústria farmacêutica no mundo.

2.3 A própolis / geoprópolis

O uso medicinal dos produtos das abelhas, especialmente o mel, tem sido relatado há centenas de anos, desde o Egito antigo, Grécia e China. As propriedades curativas e os benefícios nutricionais são mencionados em diversos textos religiosos incluindo o Veda, Bíblia e Alcorão (MÜNSTEDT e BOGDANOV, 2009).

A própolis é feita a partir de resinas coletadas de plantas, e é utilizada como parte do revestimento interno de seus ninhos, mumificação de invasores, além de reduzir a incidência de bactérias e fungos na colônia (OLIVEIRA, NUNOMORA, *et al.*, 2014).

Caracteristicamente, é um material lipofílico, sólido e quebradiço quando frio, mas macio, maleável e muito pegajoso quando quente disso resulta a nomenclatura “cola das abelhas”. Possui um agradável aroma aromático e varia de cor, dependendo da sua origem e idade (MARCUCCI, 1995.)

A própolis e/ou geoprópolis são conhecidas pelo seu alto potencial antioxidante. A *Melipona. quadrifasciata anthidioides* produz a geoprópolis a partir de resinas vegetais misturadas com barro, sendo esta uma característica exclusiva das espécies do gênero *Melipona* que a utiliza para calafetação, defesa, delimitação das colônias e na confecção da entrada das mesmas (OLIVEIRA, NUNOMORA, *et al.*, 2014).

Essa mistura de resina de exsudatos, originado a partir de várias fontes vegetais, misturado com cera e fragmentos de areia, difere da própolis de *Apis melífera*, devido à presença de partículas de argila e ausência de tricomas vegetais. Assim a geoprópolis diferencia-se principalmente da própolis, por apresentar sedimento de terra ou barro usado na sua elaboração (BARTH, 2003)

Esta denominação “geoprópolis” é utilizada para distinguir o tipo especial de própolis preparada por muitas abelhas sem ferrão como: Uruçu nordestina (*Melipona scutellaris*), Manduri (*Melipona. marginata*), Mandaçaia (*Melipona. quadrifasciata*), Jandaíra (*Melipona. subnitida*), Tujuba (*Melipona rufiventris*

mondory), Tiúba (*Melipona fasciculata*) dentre diversas outras. (NOGUEIRA-NETO, 1997).

De modo geral, as amostras da geoprópolis apresentam-se como fragmentos rígidos e com diferentes tamanhos, com grânulos de consistência heterogênea e inodoros, coloração marrom escura e sabor amargo (Figura 8) (CUNHA, DUTRA, *et al.*, 2009)



Figura 8: Geoprópolis de colônia de *Melipona q. anthidioides*. Fonte: Autor

2.3.1 Composição química e atividades biológicas da própolis e geoprópolis

Pesquisas sobre composição química da própolis começaram no início do século XX. As primeiras tentativas para determinar a composição da própolis eram feitas a partir do simples fracionamento. Um dos primeiros relatos é o de Dieterich e Helfenberg em que eles apresentam seus métodos de extração e constituintes da própolis separados em álcool, clorofórmio e éter (KUROPATRICKII, SZLISZKA e KROL, 2013).

Os primeiros relatos sobre a análise de própolis, baseados em evidências químicas, surgiram na década de 70 quando Lavie (1975) na França e Popravko

(1978) na Rússia identificaram a presença de flavonoides em própolis e compararam com a composição de exsudatos de choupo e bétula.

Em 1911, em seu trabalho posterior, Dietrich identificou a vanilina na própolis, e outro pesquisador alemão, Küustenmacher, que trabalhava com própolis, identificou o ácido cinâmico e o álcool cinâmico como componentes da própolis (KUROPATRICKII, SZLISZKA e KROL, 2013)

A composição química do geoprópolis ou própolis depende da especificidade da flora local. Muitos constituintes foram identificados, principalmente, compostos fenólicos, tais como os flavonoides, ácidos fenólicos, e ésteres de ácidos fenólicos, têm sido relatados como principais constituintes da própolis de zonas tropicais (SALGUEIRO, GUIDA e CASTRO, 2016)

Somente no Brasil já foram classificadas 13 grupos de própolis provenientes da região sul, nordeste e sudeste. Embora não exista uma composição química padrão, a composição principal são flavonoides, ácidos fenólicos e composições aromáticas (NASCIMENTO, 2018)

Quanto à flora apícola diversas espécies de abelhas foram coletadas nas flores de 44 espécies vegetais, de remanescente antropizado em Amélia Rodrigues-BA, com destaque para as famílias *Scrophulariaceae* (16,73%), e *Malpighiaceae* (14,31%). Outras espécies de plantas visitadas pelas abelhas desta região foram *Malvaceae*, *Verbenaceae*, *Asteraceae*, *Scrophulariaceae*, *Euphorbiaceae*, *Salicaceae*, *Malpighiaceae*, *Anacardiaceae*. (SILVA., 2016).

O perfil químico destes produtos apícolas tem sido estudado em diversas regiões do Brasil, no entanto, ainda há poucos estudos sobre a composição química e atividades antioxidantes, antivirais, imunomoduladores e antitumorais da geoprópolis da abelha sem ferrão, *Melipona quadrifasciata anthidioides*.

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, 2000) e ser dependente das diferentes espécies de abelhas. Em

decorrência desta composição química diferenciada, a própolis apresenta variação em suas atividades farmacológicas.

A área onde está localizado o meliponário deste estudo é composta de uma flora característica de zona ecótono com transição de vegetação oriundas da mata atlântica para caatinga (tabelas 1 e 2), que podem fornecer como recurso vegetal para as abelhas (resina, néctar e pólen). De acordo com estas informações pode-se supor que este local pode oferecer uma maior diversidade de recursos vegetais para estas abelhas a depender da espécie visitada.

Tabela 1: Plantas catalogadas em fragmento de Mata Atlântica secundária no Centro de Agroecologia Estação Rio Seco (CEARIS).

CÓDIGO	ESPÉCIE VEGETAL		PRINCIPAIS Metabólitos secundários presentes na espécie vegetal	Referência
	Nome popular (recurso utilizado pela abelha)	Nome científico		
01	Jatobá (ambos: néctar e/ou pólen e resina)	<i>(Hymenaea courbaril)</i> .	Ácidos graxos de cadeia longa, terpenos, sequeiterpenos, diterpenos e esteóides.	(SALES et al., 2014)
02	Angico (ambos: néctar e/ou pólen e resina)	<i>(Anadenanthera colubrina)</i> ;	67,8% de arabinose, 24,1% de galactose e 2,0% de ramnose.	(BISPO et al., 2017)
03	Aroeira (ambos: néctar e/ou pólen e resina)	<i>(Schinus terebinthifolius)</i> ;	Antocianinas, biflavonóide, binaringenina	(BONFANTI et al., 2014)
04	Tamboril, orelha de macaco, orelha de onça (ambos: néctar e/ou pólen e resina).	<i>(Enterolobium contortisiliquum sp.)</i> ;	taninos, flavonoides, cumarinas, triterpenos, esteroides, saponinas e alcaloides.	(MELO et al., 2008)
05	Gliricídia (ambos: néctar e/ou pólen e resina)	<i>(Gliricidia sepium)</i> ;	ácido gálico, ácido protocatecuico, p de ácido hidroxibenzóico, ácido gentísico, B ácido -resorcylic, ácido vanílico, ácido siringico, p ácido -coumaric, m ácido -coumaric, o ácido -coumaric, ácido ferúlico, ácido sinapínico (formas trans e cis), cumarina e miricetina	(DOS SANTOS et al., 2020)
06	Ingá (resina)	<i>(Inga edulis)</i> ;	ácido gálico, catequina, epicatequina, miricetina-3-ramnopiranosídeo, quercetina-3-glucopiranosídeo e quercetina-3-ramnopiranosídeo	(DE SOUSA DIAS; DE SOUZA; ROGEZ, 2010)
07	Anil, anileiro (resina)	<i>(Indigofera spp.)</i> ;	apigenina, leisona , juglona e indigotina	(SEEDS et al., 2020)
08	Jurema (ambos: néctar e/ou pólen e resina)	<i>(Mimosa tenuiflora)</i> ;	flavonoides catequina e apigenina.	(BORGES et al., 2017)
09	Leucena (ambos: néctar e/ou pólen e resina)	<i>(Leucaena leucocephala)</i> ;	isovanilina, ácido gálico, ácido cafeico, apigenina-8- C- glucósido (vitexina), quercetina 3- O- galactósido (hiperósido), luteolina-7- O- glucósido, quercetina, isorranotina, luteolina 6-metil éter (neptin), éter 3,7-dimetílico do caempferol e éter tetrametil 5,7,3', 4'-di-hidroquercetina (éter taxifolin 5,7,3', 4'-tetrametilico)	(ABDELHADY; ABDALLAH, 2016)
10	Mulungu (resina)	<i>(Erythrina velutina)</i> ;	Fenilpropanóides, Asarona, cariofileno , eugenol e ácidos graxos	(TEIXEIRA; DE MORAES; DA CAMARA, 2019)

11	Murta-de-cheiro (resina)	(<i>Murraya paniculata</i>);	Flavonas, flavanonas ou chalconas	(MARTÍN, 2018)
12	Pau-Brasil (ambos: néctar e/ou pólen e resina)	(<i>Caesalpinia echinata</i>);	ácido lambertiano, diterpenos	(MITSUI et al., 2015)
13	Pau-ferro, Jucá (ambos: néctar e/ou pólen e resina)	(<i>Caesalpinia ferrea</i>);	ácido gálico, ácido carboxílico, ácido elágico, vitexina, cloretoin, isovitexina	(ROCHA et al., 2011)
14	Saco-de-bode (resina)	(<i>Swartzia acutifolia</i>).		

Fonte Centro de Agroecologia Rio Seco – CEARIS-UEFS- Amélia Rodrigues-Ba – 2014.

Tabela 2: Diversidade de fruteiras catalogadas e sua abundância relativa, no Centro de Agroecologia Rio Seco - CEARIS. Amélia Rodrigues-BA – 2014.

Código	Nome popular	Nome científico	PRINCIPAIS Metabólitos secundários presentes no vegetal	Referência	Abundância relativa
01	Coqueiro (pólen e ou néctar.	(<i>Cocos nucifera</i>)	quercetina, ácido clorogênico, ácidos vanílico, ferúlico, cafeíco, gálico e catequina.	(NEVES, 2015)	335
02	Cajueiro (resina)	(<i>Anacardium occidentale</i>)	flavonoides, em sua maioria derivados de quercetinas, e galotaninos	(GOMES et al., 2018)	130
03	Pitangueira (pólen e ou néctar.	(<i>Eugenia uniflora</i>)	Ácido gálico, ácido elágico e flavonoides	(NASCIMENTO, 2013)	125
04	Limoeiro (ambos: néctar e/ou pólen e resina)	(<i>Citrus aurantifolia</i>)	Naringenina e hesperetina e seus glicosídeos (cerca de 10 a 15%)	(LI-YUN, CHENG-HUNG, et al., 2019)	104
05	Mangueira (plantas não visitadas pelas abelhas ou que ainda não foram vistas)	(<i>Mangifera indica L.</i>)	Compostos fenólicos, flavonoides mangiferina	(JUNIOR; SANTOS, 2013)	64
06	Bananeira (resina)	(<i>Musa spp.</i>)	Ácido gálico	(LOPES, 2019)	55
07	Umbu-cajazeira (ambos: néctar e/ou pólen e resina)	(<i>Spondias mombin</i>)	compostos fenólicos, quercetina, ácido elágico e campferol, ácido clorogênico o ácido quínico, a epicatequina, o ácido glucónico, a procianidina B, a procianidina C, o dímero da etil-epicatequina, a quercetina di-hexose e a quercetina – O-hexose-O-pentose, o 7-Glucosilo-11-metil-oleosido e o ácido 3,4,5-Tri-O- galoilquínico,	(CABRAL, 2014)	28
08	Abacateiro (ambos: néctar e/ou pólen e resina)	(<i>Persea americana</i>)	ácido gálico, epicatequina, quercetina 3-O-rutinosídeo, quercetina 3-O-neohesperidosídeo, quercetina 3-O-robinosídeo, catequina, ácido clorogênico, argentinina (1-N,N-dimetil-etil-4,6- dimetoxi-3,8-di-hidroxi-fenantreno), kaempferol 3-O-rutinosídeo, quercetina 3-O-glicosídeo, quercetina e kaempferol	(ASSUNÇÃO, 2016)	18
09	Graviola (resina)	(<i>Annona muricata</i>)	ácidos graxos e fitoesteróides, como o ergosta-4,6,22-trieno, 4,4-dimetil-colesta-6,22,24-trieno, β-sitosterol, tremulona, campesterol e estigmasterol, além do ácido cinâmico	(TÉLLEZ, VÁSQUEZ, et al., 2019)	13
10	Jenipapeiro (resina)	(<i>Genipa americana</i>)	ácido clorogênico, miricetina-3-glicosídeo, mearnsitrina, germanicol	(BARBOSA, 2008)	12
11	Sapotizeiro (resina)	(<i>Manilkara zapota</i>)	ácidos fenólicos (ácido p-hidroxibenzóico, ácido gálico e epicatequina)	(MOURÃO, 2017)	10
12	Amora (plantas não visitadas pelas abelhas ou que ainda não foram vistas)	(<i>Rubus sp.</i>)		(CHAVES, 2017)	09

13	Jambeiro (pólen e ou néctar.	<i>(Syzygium jambos)</i>	compostos fenólicos: ácido gálico, elágico e clorogênico, catequina e epicatequina, rutina, quercitina e quercitrina, isoquercitrina e canferol	(BONFANTI et al., 2014)	09
14	Seriguela (resina)	<i>(Spondias purpurea)</i>	Ácidos fenólicos: galoil glicose e ácido gálico, ácido 3-cafeoilquínico, ácido quínico, ácido cafeico. flavonóis : quercetina flavonoides: kaempferol e rhamnetina.	SOLORZANO-MORÁN, 2015	08
15	Mamoeiro (resina)	<i>(Carica papaya L.)</i>	Carotenóides, fenólicos totais	(SENA, 2018)	06
16	Jaqueira (resina)	<i>(Artocarpus heterophyllus)</i>	*	*	06
17	Goiabeira (ambos: néctar e/ou pólen e resina)	<i>(Psidium guajava L.)</i>	Ácido gálico, flavonoides, taninos	(CHIARI et al., 2012)	06
18	Fruta-pão (resina)	<i>(Artocarpus altilis L.)</i>	estilbenos arilbenzofurano, flavanona, flavonas, triterpenos e esteróis	(AMARASINGHE et al., 2008)	04
19	Figueira (resina)	<i>(Ficus carica L.)</i>	Macluraxantona, rutina, ácido clorogênico e psoraleno	(AREF et al., 2010)	03
20	Aceroleira (resina)	<i>(Malpighia glabra L.)</i>	malvidina, quercetina, kaempferol, ácido caféico, ácido felúrico	(MOREIRA, 2013)	03
21	Jaboticabeira (ambos: néctar e/ou pólen e resina)	<i>(Plinia cauliflora)</i>	Flavonoides, ácido elágico e de ácido gálico.	(SOUZA-MOREIRA et al., 2011)	03
22	Abiu (ambos: néctar e/ou pólen e resina)	<i>(Pouteria caimito)</i>	terpenos	(MARIO et al., 2012)	03
23	Pupunha (pólen e ou néctar.	<i>(Bactris gasipaes)</i>	Carotenoides	(JATUNOV et al., 2010)	03
24	Açaízeiro (ambos: néctar e/ou pólen e resina)	<i>(Euterpe oleracea)</i>	Antocianinas: cianidina 3-glucosídeo e cianidina 3-rutinosídeo Fenóis,	(YUYAMA et al., 2011)	02
25	Jamelão (ambos: néctar e/ou pólen e resina)	<i>(Syzygium cumini)</i>	flavonoides, antocianinas, taninos, ácido ascórbico, carotenoides	(MIGLIATO et al., 2007)	02
26	Caramboleira (ambos: néctar e/ou pólen e resina)	<i>(Averrhoa carambola)</i>	Tocoferol β-caroteno, α-tocoferol	(DASGUPTA, 2013)	01
27	Ingazeira (ambos: néctar e/ou pólen e resina)	<i>(Inga edulis Mart)</i>	Ácido gálico, catequina, epicatequina, miricetina, quercetina	(DE SOUSA DIAS; DE SOUZA; ROGEZ, 2010)	01
28	Fruta do conde, pinha, ata (ambos: néctar e/ou pólen e resina)	<i>(Annona squamosa L.)</i>	Carboidratos, flavonoides, alcaloides	(VARADHARAJAN, 2012)	01
29	Cupuaçu (ambos: néctar e/ou pólen e resina)	<i>(Theobroma grandiflorum)</i>	Teofilina, teobromina, cafeína	(COSTA, LAMARÃO e YAMAGUCHI, 2019)	01
30	Noni (ambos: néctar e/ou pólen e resina)	<i>(Morinda citrifolia L.)</i>	Rutina, quercetina, kaempferol	(MOREIRA, 2017)	01
31	Bilimbi ou biri biri (ambos: néctar e/ou pólen e resina)	<i>(Averrhoa bilimbi)</i>	ácido nicotínico, ácido pantotênico e catequina	(IWANSYAH et al., 2021)	01

Outras espécies vegetais como Capim de corte (*Pennisetum purpureum*), Palma (*Opuntia ficus-indica*), Sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia*) e Nin (*Azadirachta indica*), ainda também foram catalogadas na área de CEARIS.

Nos quintais da comunidade Quatro Estrada numa distância entorno de (500m a 2.000m) do CEARIS, foram catalogadas ainda as espécies vegetais (tabela 3), além de abóbora (*Cucurbita pepo*), milho (*Zea mays*), diversas hortaliças e plantas medicinais. Esta flora local descrita pode servir como fonte de recursos para a produção da geoprópolis aqui estudada.

Tabela 3: Diversidade de espécies catalogadas no entorno do CEARIS (500m a 2.000m). Amélia Rodrigues-BA – 2014

	Nome popular	Nome científico
01	Abacate	(<i>Persea americana</i>)
02	Abacaxi	(<i>Ananas comosus</i>)
03	Açaí	(<i>Euterpe oleracea</i>)
04	Amora	(<i>Rubus sp.</i>)
05	Acerola	(<i>Malpighia glabra</i>)
06	Banana	(<i>Musa sp</i>)
07	Biri-Biri ou Bilimbi	(<i>Averrhoa bilimbi</i>)
08	Caju	(<i>Anacardium occidentale</i>)
09	Cacau	(<i>Theobroma cacao</i>)
10	Carambola	(<i>Averrhoa carambola</i>)
11	Coco	(<i>Cocos nucifera</i>)
12	Cupuaçu	(<i>Theobroma grandiflorum</i>)
13	Fruta do Conde ou pinha ou ata	(<i>Annona squamosa</i>)
14	Fruta Pão	(<i>Artocarpus altilis</i> L.)
15	Goiaba	(<i>Psidium guajava</i> L.)
16	Graviola	(<i>Annona muricata</i>)
17	Groselha	(<i>Ribes rubrum</i>)
18	Jenipapeiro	(<i>Genipa americana</i> L.)
19	Jabuticaba	(<i>Plinia cauliflora</i>)
20	Jaca	(<i>Artocarpus heterophyllus</i>)
21	Jambo	(<i>Syzygium jambos</i>)
22	Laranja	(<i>Citrus X sinensis</i>)
23	Lima	(<i>Citrus limettoides</i>)
24	Limão	(<i>Citrus x limon</i>)
25	Mabolo	(<i>Diospyrus mabolo</i>)
26	Mamão	(<i>Carica papaya</i>)
27	Manga	(<i>Mangifera indica</i>)
28	Nespera	(<i>Mespilus germanica</i>)
29	Pitangueira	(<i>Eugenia uniflora</i> L)
30	Sapoti	(<i>Manilkara zapota</i>)
31	Seriguela	(<i>Spondias purpurea</i>)
32	Tangerina	(<i>Citrus reticulata</i>)

A caracterização e a padronização química da geoprópolis, levando em conta as condições ambientais em que são produzidos, são fundamentais para melhorar a qualidade desses produtos e dar garantia às pessoas que os compram e os consomem (DUTRA, NOGUEIRA, *et al.*, 2008).

Dessa mesma forma, o conhecimento da composição química e das atividades biológicas da geoprópolis é de extrema relevância, contribuindo para o estabelecimento do controle de qualidade deste produto e de uma legislação específica, além de conscientizar a população sobre a importância da conservação de abelhas nativas, valorizando importantes produtos da nossa biodiversidade (ARAÚJO, 2013).

2.3.2 COMPOSTOS FENÓLICOS

Entre os grupos biologicamente ativos mais importantes descritos na própolis, estão os compostos fenólicos, podemos destacar os ácidos gálico, vanílico, ferúlico, p-cumárico, éster fenetílico do ácido cafeico (CAPE), ácidos cafeico e siringíco, que são comuns em produtos apícolas (Figura 9) (SILVA, MUNIZ e NUNOMURA, 2013). Os compostos fenólicos são originados do metabolismo secundário das plantas, sendo essenciais para o seu crescimento e reprodução, além disso se formam em condições de estresse como, infecções, ferimentos, radiações UV, dentre outros (ANGELO e JORGE, 2007)

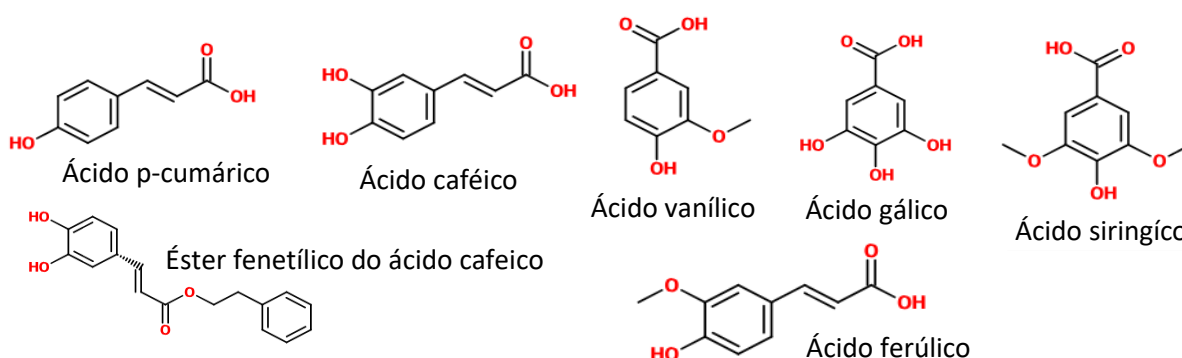


Figura 9: Grupos biologicamente ativos mais importantes encontrados na própolis de acordo com a literatura científica. Fonte: Figuras criadas pelo autor utilizando o programa de modelagem ChemsSketch.

Quimicamente, os fenólicos são definidos como substâncias que possuem anel aromático, pertencem a uma classe de compostos que inclui uma grande diversidade de estruturas, simples e complexas, com um ou mais substituintes

hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais. Possuem estrutura variável e com isso, são multifuncionais. Existem cerca de cinco mil fenóis, dentre eles, destacam-se os flavonoides, ácidos fenólicos, fenóis simples, cumarinas, taninos, ligninas e tocoferóis (ANGELO e JORGE, 2007).

Compostos fenólicos pertencem a uma classe que inclui uma grande diversidade de estruturas, simples e complexas, que possuem pelo menos um anel aromático no qual, ao menos, um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila. Estão amplamente distribuídos no reino vegetal e nos microrganismos, fazendo também parte do metabolismo animal (DEWICK, 1998).

Este grupo, pode-se dividir em flavonoides (antocianinas, flavonóis e seus derivados), ácidos fenólicos (ácidos benzóico, cinâmico e seus derivados) e cumarinas (ANGELO e JORGE, 2007). Dentre os flavonoides encontrados na própolis podemos destacar alguns flavonóis: galangina, campeferol, quercetina, miricetina, algumas flavonas: crisina, apigenina, luteolina, tectocrisina, e as flavanonas: pinocembrina, isosacuranetina, naringenina (SILVA, MUNIZ e NUNOMURA, 2013) (Figura 10).

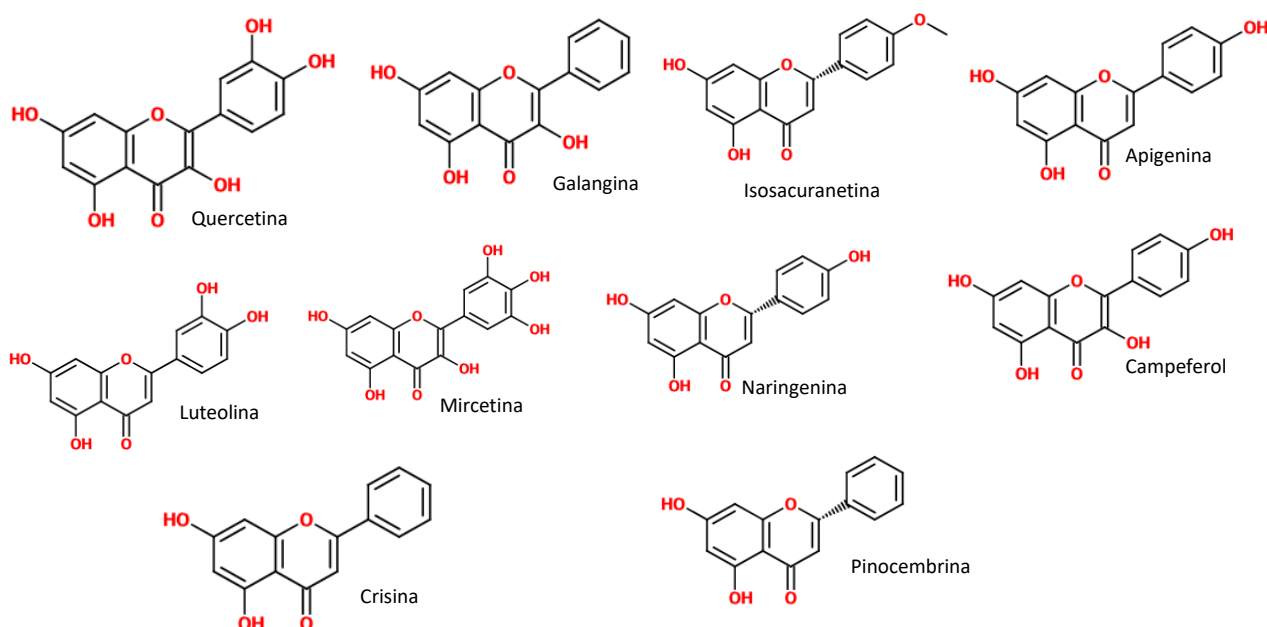


Figura 10: Flavonoides encontrados na própolis. Fonte: Figuras criadas pelo autor utilizando o programa de modelagem Chemscketch.

Podem ser formados através de duas rotas biogénicas: pela via do ácido chiquímico a partir de carboidratos, ou pela via do acetato-polimalato que inicia com acetil-coenzima A e malonil-coenzima A. A origem biogénica determina o padrão de substituição dos compostos fenólicos resultantes. Dessa maneira, pela via do ácido chiquímico obtém-se composto com grupos hidroxilas em posições orto, que se formam a partir do ácido cinâmico. Por outro lado, a via do acetato-polimalato origina compostos com grupos hidroxilas dispostos em meta (DEWICK, 1998).

2.3.3 Importância farmacológica da geoprópolis

Entre os compostos químicos descritos como responsáveis pela atividade antimicrobiana de produtos naturais estão os flavonoides. Em bactérias, elas são capazes de inibir a DNA girase, danificando as membranas celulares, reduzindo sua fluidez e diminuindo o metabolismo energético microbiano, esses mecanismos são responsáveis por seus efeitos antibacterianos. Além desses, os diterpenos também são descritos como possuir atividade antimicrobiana, pois penetram facilmente nas membranas celulares de microrganismos e criam poros que resultam na perda de conteúdo intracelular (SANTOS, J. F. C., *et al.*, 2017).

Investigações de geoprópolis de *Melipona fasciculata* mostrou atividade antimicrobiana contra *S. mutans* e *C. albicans* como uma ação imunomoduladora, devido ao aumento de citocinas no sistema anti-inflamatório (LUSTOSA, GALINDO, *et al.*, 2008).

A atividade anticarcinogênica dos fenólicos tem sido relacionada à inibição dos cânceres de cólon, esôfago, pulmão, fígado, mama e pele. Os compostos fenólicos que possuem este potencial são resveratrol, quercetina, ácido caféico e flavonóis (ANGELO e JORGE, 2007)

Freires, Alencar e Rosalen (2016), estudaram o potencial farmacológico e nutracêutico da própolis vermelha brasileira e seus constituintes bioativos. A própolis vermelha brasileira exibe uma ampla gama de propriedades biológicas e pode, potencialmente, ter um impacto contra um número de doenças humanas com atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante e anticancerígena.

Por um lado, a pesquisa química e biológica mostrou que alguns dos compostos de própolis brasileira têm alto potencial para se tornarem drogas alopáticas. A própolis já é conhecida em muitos países com legislação avançada, como o Japão. Nos dois cenários (farmacêutico e funcional), a própolis brasileira parece agregar não apenas benefícios à saúde para a comunidade, mas também valor econômico internacional (FREIRES, ALENCAR e ROSALEN, 2016).

Dentre diversos produtos naturais atualmente estudados, os flavonoides têm merecido destaque em virtude da sua ampla gama de ações biológicas e terapêuticas demonstradas tanto em condições experimentais como em seres humanos. (FLAMBÓ, 2013).

Entre os produtos apícolas, a própolis tem sido objeto de estudos farmacológico devido suas propriedades antimicrobianas (SIMÕES, ARAÚJO e ARAÚJO, 2008), anti-inflamatório (BORRELLI, MAFFIA, *et al.*, 2002), propriedades antioxidantes (MARQUELE, OLIVEIRA, *et al.*, 2006), analgésica, cicatrizante, anticariogênica e anestésica (DUTRA, NOGUEIRA, *et al.*, 2008).

Tais efeitos terapêuticos têm sido atribuídos aos inúmeros compostos polifenólicos recorrentes em sua composição, cujos principais podem ser considerados flavonoides e ácidos fenólicos. (DUTRA, NOGUEIRA, *et al.*, 2008)

Este potencial biológico é devido a uma sinergia que ocorre entre os vários constituintes. A própolis é uma importante alternativa terapêutica, do ponto de vista econômica, e farmacologicamente eficiente, de fácil obtenção, apresentando propriedades farmacêuticas (ALENCAR, AGUIAR, *et al.*, 2005).

A identificação de suas propriedades tem por objetivo, além da pesquisa e desenvolvimento de novas drogas, a agregação de valor econômico à própolis bruta, criando uma fonte econômica de exploração agrícola e extrativismo autossustentável (MENEZES, 2005).

A investigação da constituição química da própolis é fundamental para a associação entre os compostos bioativos presentes nela com as respectivas propriedades farmacológicas (OLIVEIRA, 2012).

O interesse sobre as propriedades biológicas e a composição química dos produtos das abelhas sem ferrão também tem aumentado nos últimos anos. No entanto, em relação a geoprópolis, os estudos ainda são escassos. Os poucos estudos disponíveis na literatura têm mostrado que este subproduto possui atividade antibacteriana e antioxidante e contém, uma alta concentração de compostos fenólicos e flavonoides.

Atualmente existem diversos produtos contendo própolis comercializados em todo mundo, principalmente no Japão, tais como balas, chocolates, doces, xampus, cremes para pele, soluções antissépticas, pastas de dente, etc. (PARK., K, *et al.*, 1998).

A geoprópolis enquanto fornecedora de ativos químicos, também possuem um grande potencial para a produção destes produtos pela indústria alimentícia e farmacêutica.

2.4 Atividade antimicrobiana

Uma das atividades mais avaliadas da própolis é sua ação antimicrobiana frente a bactérias, fungos e vírus, embora seu mecanismo de ação ainda não esteja completamente elucidado (FARNESI e ET.AL., 2009).

A atividade antimicrobiana da própolis é atribuída principalmente aos flavonoides pinocembrina, galangina, pinobanksina, pinobanksin-3-acetato, éster benzílico do ácido p-cumárico e misturas de ésteres de ácido café (MARIQUE e SANTANA, 2008).

Segundo estudo realizado com o extrato de própolis da Cayería Norte de Caibarién demonstra que ele pode ser usado no tratamento de feridas, queimaduras e úlceras estomacais. As espécies bacterianas mais sensíveis encontrados foram para *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* (BERNAL e ET AL., 2007).

O *Staphylococcus aureus* torna-se patogênico em condições como a quebra da barreira cutânea ou diminuição da imunidade. Os traumas que comprometem a integridade da barreira cutânea constituem-se na principal causa

de mudança de comportamento desse microrganismo para agente etiológico mais comum de infecções cutâneas (GELATTI, BECKER, *et al.*, 2009).

Esse microrganismo é responsável por uma grande variedade de infecções, como infecções na pele e no subcutâneo, infecções pós-cirúrgicas, osteomielites, pneumonias, abscessos, endocardites e bacteremia. É umas das causas mais comuns de infecções nosocomiais, bem como de infecções comunitárias que podem apresentar altos índices de morbidade e mortalidade (GELATTI, BECKER, *et al.*, 2009)

A comprovação da eficácia das substâncias ativas usadas nos produtos cosméticos, bem como os efeitos ocasionados pelas formulações na pele humana têm sido objetos de estudo da comunidade científica, pois resultam no desenvolvimento técnico e científico da área cosmética, a qual vem evoluindo cada vez mais e ganhando espaço nesta época de valorização da qualidade de vida (LIONARDI, GASPAR e CAMPOS, 2002).

A pesquisa em cosmetologia tem-se ampliado cada vez mais, devido à contribuição e parceria de várias áreas das ciências básicas e aplicadas, entre elas a farmacologia, dermatologia, histologia, anatomia, fisiologia, microbiologia, química e física (LIONARDI, GASPAR e CAMPOS, 2002).

2.5 Sistemas de Carreamento de Ativos

A ideia de promover a permeação de um determinado medicamento através da pele é antiga. O manuscrito egípcio papiro de Ebers, elaborado em torno de 1550 a.C., já menciona o uso do extrato da mamona, *Ricinus communis* L., sobre a pele para tratar dores de cabeça (SERAFIM, GOBBI, *et al.*, 2013).

Com o advento do materialismo, a ideia de que a pele seria permeável se perdeu, de forma que em 1877, Fleischer chegou a publicar um estudo científico que comprovava a partir de experimentos e avaliação crítica a total impermeabilidade deste órgão (SERAFIM, GOBBI, *et al.*, 2013).

Essa teoria foi invalidada em 1905 quando Malkinson e Ferguson executaram o primeiro experimento comprovando a absorção percutânea em seres humanos (SERAFIM, GOBBI, *et al.*, 2013).

Em 1975, Idson demonstrou que a epiderme seria o fator limitante à permeação, e que uma vez que a substância atravessasse o estrato córneo, a absorção sistêmica estaria garantida (SERAFIM, GOBBI, *et al.*, 2013).

Há uma grande diversidade em sistemas de nanopartículas para transportar para o tecido alvo fármaco-fármaco ou fármaco-fitoquímicos de modo a facilitar a permeação da epiderme, garantindo assim maior eficiência dos ativos (VALDEZ, TONIN, *et al.*, 2012).

A encapsulação é conhecida por propiciar proteção dos compostos bioativos instáveis da degradação pela luz, oxigênio, pH, umidade ou da interação com outros componentes da matriz alimentar, facilitando assim sua aplicação e seu armazenamento. Outro aspecto importante da microencapsulação é permitir a liberação gradual do composto bioativo no local onde será absorvido (CHUANHE, 2016).

Entretanto Brasileiro (2011) recomenda que a técnica seja aplicada a produtos que apresentem baixa biodisponibilidade como, por exemplo, substâncias hidrofóbicas e material resinoso como a própolis. A microencapsulação também pode aumentar a solubilidade do composto de interesse, além disto, pode minimizar os efeitos indesejáveis do sabor, odor e da coloração (KLEIN *et al.* 2015).

2.5.1 Lipossomas

Os lipossomas são os nanocarreadores mais comuns e bem buscados para administração direcionada de fármacos. Eles têm se apresentado como uma melhoria para um conjunto de aplicações biomédicas através da estabilização de compostos terapêuticos, da superação de barreiras à absorção celular e de tecidos e do melhoramento da biodistribuição de compostos para locais-alvo *in vivo* (HUA e WU, 2013).

Lipossomas são vesículas microscópicas compostas de uma ou mais bicamadas lipídicas concêntricas, separadas por um meio aquoso (Figuras 11 e 12). Eles podem encapsular substâncias hidrofílicas e/ou lipofílicas, sendo que as primeiras ficam no compartimento aquoso e as lipofílicas inseridas ou adsorvidas na membrana. Por serem biodegradáveis, biocompatíveis e não imunogênicos são altamente versáteis para pesquisa, terapêutica e aplicações analíticas (BOZZUTO e MOLINARI, 2015).

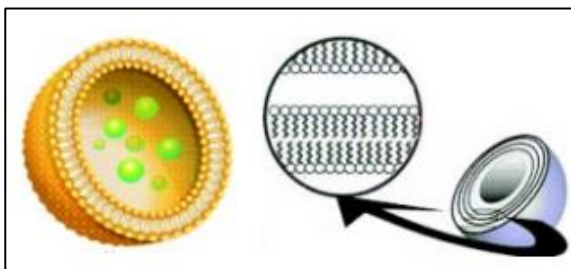


Figura 11: Estrutura de lipossomas unilamelar e multilamelar.

Disponível

em: <<http://quimicaparatodosuevora.blogspot.com/2011/01/li>

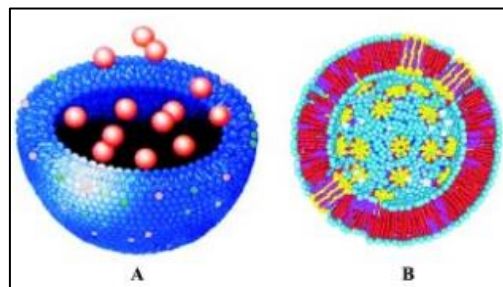


Figura 12: (A) Lipossoma unilamelar contendo substâncias ativas solubilizadas na fase aquosa e na bicamada lipídica. (B) Corte: Lipossoma unilamelar contendo substâncias ativas transversal de lipossoma unilamelar

Desde que foram descritos pela primeira vez em 1965 por Bangham, os lipossomas passaram por uma enorme e rápida evolução no sentido de produzir sistemas usados para uma ampla variedade de aplicações (TORCHILIN, 2005), em particular em áreas científicas como medicina e ciências farmacêuticas (LASIC, 1993).

A sua utilização tem sido descrita no tratamento de doenças cancerígenas, doenças infecciosas, inflamações, no desenvolvimento de vacinas, como meios auxiliares ao diagnóstico médico (agentes de contraste), e no desenvolvimento de terapias genéticas (entrega de ácidos nucleicos). Além das várias aplicações terapêuticas referidas, os lipossomas também são usados em áreas como cosmética e nutrição (DELGADO, 2013).

A obtenção dos lipossomas pode ser realizada por diversos processos, sendo que seu princípio básico se dá pela formação de um filme lipídico, através da dissolução dos lipídeos em solventes orgânicos e posterior evaporação; seguida de uma hidratação deste filme com água ou solução tampão, sob agitação magnética, formando assim a dispersão lipossomal. O fármaco a ser

encapsulado é inserido na solução tampão, quando hidrofílico; ou dissolvido na mistura lipídica, quando lipofílico. Através desta técnica podem-se obter as partículas MLVs, as partículas mais básicas. (BATISTA, CARVALHO e MAGALHÃES, 2007).

Sabendo-se que a escolha do método de obtenção dos lipossomas é orientada pelas propriedades do material a ser encapsulado, pela necessidade de aplicação e pelo mecanismo de liberação do mesmo, tratando-se de fármacos os três principais métodos de obtenção são: a evaporação em fase reversa, a extrusão e a coacervação (BRASILEIRO, 2011).

Para a aderência de uma capacidade alvo específica ainda maior aos lipossomas, pode ser feito ainda, o acoplamento de ligantes com tal propriedade. Os mais empregados são as imunoglobulinas (Ig) da classe IgG, anticorpos de memória. Desta maneira os lipossomas passam a serem denominados lipossomas sítio-específicos, chamados de imunolipossomas (CUNHA, SOARES e GASPARI, 2007).

O crescente interesse na pesquisa com lipossomas deve-se ao fato que a via transdérmica oferece uma série de vantagens em comparação com as vias tradicionais de administração de fármacos, sendo elas:

- evitar efeito hepático de primeira passagem, aumentando a biodisponibilidade;
- liberação controlada do fármaco por um período prolongado, eliminando a necessidade de múltiplas doses;
- não invasividade e autoadministração, o que melhora a adesão do paciente (LIUZZI et al., 2016; PALMER & DELOUISE, 2016; SILVA et al., 2010).

Entretanto, de acordo com Soares (2017), também existem uma série de desvantagens do uso deste sistema, como:

- possibilidade de irritação localizada ou reações alérgicas cutâneas;
- demora no início da ação do fármaco;
- não deve ser aplicado em locais com irritação e/ou com lesões;

- longo período na etapa de remoção do solvente;
- produção em pequena escala;
- baixa eficiência de encapsulação, baixo rendimento e instabilidade do sistema;
- resíduo de solvente orgânico, (SOARES, 2017).

2.5.1.1 Microemulsão transdérmica PLO (pluronic® lecithin organogel).

A formulação denominada Pluronic Lecithin Organogel (PLO) foi desenvolvida em 1990, por Marty Jones e Lawson Kloesel. Esta formulação utilizada para liberação transdérmica de fármacos é na verdade uma emulsão com características sensoriais de gel, contendo uma fase hidrossolúvel (gel aquoso de Polaxamer 407 de 20 a 40%) e uma fase lipossolúvel (palmitato de isopropila e lecitina de soja). (ALSAAB, 2016).

Os PLOs são sistemas bifásicos visco-elásticos termodinamicamente estáveis e ganharam importância na entrega de medicamentos nos últimos anos devido à sua natureza anfifílica, o que torna possível veicular fármacos de natureza polar ou apolar, sendo incorporados na fase aquosa ou oleosa, respectivamente (BALAGURU, RAMYA DEVI e & VEDHA HARI, 2014).

De acordo com Jhawat et al. (2016), este organogel interage com o estrato córneo da pele e desorganiza as camadas lipídicas, com efeitos danosos mínimos, promovendo a penetração do ativo até a circulação sistêmica via fluxo dérmico-epidérmico. Tal mecanismo é admissível devido à interação entre os fosfolipídios da formulação com os lipídios da pele.

A microencapsulação é uma tecnologia em que pequenas partículas sólidas, líquidas ou gasosas, conhecidas como material de recheio ou ativo são revestidas por um material de parede, formando partículas denominadas microcápsulas, micropartículas, ou microesferas, apresentando diferenças na morfologia e estrutura interna (FIB, 2013). A microcápsula é idealmente esférica com estrutura fortemente influenciada pelo material original e pelos métodos de preparação e com tamanho que pode oscilar desde frações de micron a alguns milímetros (SUAVE, DALL'AGNOL, *et al.*, 2006).

No campo farmacêutico as pesquisas desenvolvidas objetivaram avaliar a própolis microencapsulada no tratamento contra diabetes tipo II, em ratos (LI et al. 2012); aplicação tópica nasal da própolis nanoencapsulada (RASSU et al. 2015); desenvolver uma base com niossomas e extrato de própolis para melhorar sua eficácia terapêutica através de aplicação tópica, aumentando sua retenção na pele e mantendo a ação antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* (PATEL et al. 2015); produzir nanopartículas lipídicas de subprodutos de própolis para cicatrização de feridas tanto *in vitro* quanto e *in vivo* (ROSSETO et al. 2017), além do estudo de Balata, (2014) que formulou um organogel de lecitina contendo extrato da própolis com o objetivo de melhorar sua disponibilidade a atividade antimicrobiana.

A encapsulação da geoprópolis em organogéis é um tema bastante inovador e sem nem um trabalho relatado na literatura. As poucas pesquisas que existem se referem à própolis da abelha *Apis mellifera*.

2.5.2 Bases galênicas

As bases do Formulário Nacional definem base galênica, como uma preparação composta de uma ou mais matérias-primas, com fórmula definida, destinada a ser utilizada como veículo/excipientes de preparações farmacêuticas. Constituem veículos de natureza líquida ou semissólida destinados à incorporação de substâncias ativas (BRASIL, 2005).

O uso de bases galênicas possibilita a padronização das formulações, bem como confere estabilidade e homogeneidade. Além disso, as bases podem ser utilizadas no preparo de fórmulas farmacêuticas diferenciadas, destinadas às pessoas de todas as idades, inclusive gestantes, lactantes, crianças, diabéticos, celíacos e pessoas com intolerâncias ou alergias. (ESTOPA, 2019).

As bases galênicas são amplamente utilizadas devido não só as vantagens supracitadas, mas também pela disponibilidade e relativamente baixo valor de matérias primas no mercado nacional (ZIMMERMENN, 2009).

Estudos que consideram custo x benefício de medicamentos preparados a partir de bases galênicas ressaltam uma relação favorável à utilização destas.

Além disso, há grande aceitabilidade das emulsões por parte dos pacientes, isso as tornam o veículo mais usualmente empregado para tratamento da pele (BORELLA e PEREIRA, 2017).

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 eles, da biodisponibilidade do fármaco na formulação final e de sua estabilidade (KOROLKOVAS, 2002).

Segundo Bittencourt (2014) a formulação semissólida do tipo creme mostrou-se eficiente quando da incorporação da própolis vermelha; o autor afirma ainda a escolha desta base como ideal quando pondera os parâmetros anteriormente relacionados além do custo, aparência, estabilidade, com os dados da atividade do produto.

O desígnio do veículo ideal para a incorporação do extrato hidroalcolólico da geoprópolis da abelha *Melipona quadrifasciata anthidioides* e o seu incremento levou em consideração, além dos aspectos acima descritos, as características específicas da própolis como efetividade já exposta na base selecionada, solubilidade e incorporação, além da influência do pH e a espalhabilidade da formulação.

Segundo Gennaro (2012),

“Emulsões são sistemas de duas fases nas quais um líquido está disperso através de outro líquido na forma de pequenas gotas.”

Ainda de acordo com este autor, sempre que a fase dispersa é oleosa e a contínua é aquosa diz-se do sistema emulsão de óleo em água (O/A). O inverso também ocorre, sempre que a fase dispersa é aquosa e a contínua oleosa, diz-se do sistema emulsão de água em óleo (A/O).

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). Outra classificação distingue as bases semissólidas que incluem fórmulas de cremes,

géis, pastas, pomadas e condicionadores capilares e as líquidas, loções, xaropes e xampus (BRASIL, 2005).

Os cremes são emulsões heterogêneas, termodinamicamente instáveis, que frequentemente estão associados a agentes emulsificantes (tensoativos) (GENNARO, 2004; RIBEIRO, 2002).

Os principais representantes dos emulsionantes aniônicos utilizados em emulsões O/A são os emulsionantes de metais alcalinos e de amônio (sais de sódio, potássio ou amônia de ácidos graxos de cadeia longa - estearato de sódio; cetil fosfato de potássio), aminados (trietalomanina) e compostos sulfatados e sulfonados (lauril sulfato de sódio) (ZAANON, 2010).

Os emulsionantes aniônicos dissociam-se em solução aquosa formando íons carregados negativamente. São emulsionantes muito utilizados, e possuem geralmente baixo custo. Um exemplo clássico de uma emulsão base aniônica (creme aniônico) é a obtida com o uso da conhecida cera Lanette N® (álcool cetoestearílico e cetil estearil sulfato de sódio) que possui excelente estabilidade e aceita muito bem vários ativos de diferentes perfis (BRASIL, 2012).

Na forma creme as bases mais utilizadas na farmácia magistral são o creme Polawax® e creme Lanette® , devido ao custo baixo e facilidade de incorporação para a maioria das substâncias ativas. Lanette® é uma cera auto-emulsionante de natureza aniônica, muito bem utilizada e estabelecida. O Polawax (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 (BITTENCOURT, P., *et al.*, 2014).

O uso de cremes ou extratos contendo própolis tem sido amplamente testado na dermatologia: no tratamento de feridas abertas, queimaduras e úlceras externas, com resultados promissores, por apresentar propriedades anti-inflamatórias. No estudo de Paixão e colaboradores que avaliaram efeito da própolis na aceleração do processo de reparo tecidual, e na pesquisa de Jautová

(2019) que sugere a própolis como ingrediente farmacêutico ativo de medicamentos tópicos para o tratamento do herpes labial de especial importância para pacientes para os quais o tratamento padrão atual não está disponível ou não é tolerado.

Ao mesmo tempo percebe-se uma defasagem de pesquisas com elaboração de formulações semissólidas contendo o extrato da geoprópolis como ativo principal; a maioria das pesquisas utilizam a própolis proveniente das abelhas *Apis mellifera*.

Para tanto 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 (BITTENCOURT. e OLIVEIRA, 2008).

O estudo da estabilidade fornece indicações sobre o comportamento do produto, em determinado intervalo de tempo, frente a condições ambientais a que possa ser submetido, desde a fabricação até o término da validade. (BRASIL, 2004).

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 de 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.

Reações de degradação podem alterar o pH, sendo este indicador da qualidade. O pH também pode alterar a biodisponibilidade do produto. A depender do pH, o ativo estará na forma ionizada, o que dificulta a absorção pelo endotélio, o controle do pH em uma formulação pode facilitar o restabelecimento do

equilíbrio microbiano local, agindo sinergicamente com o ativo antimicrobiano (CATLIN, 1992).

A estabilidade física do produto pode ser verificada pela exposição dele ao estresse mecânico. A centrifugação do produto é utilizada para observar a separação (quebra) de fases e conseqüentemente sua estabilidade física. A força da gravidade atua sobre os produtos, fazendo com que suas partículas se movam no seu interior (PROENÇA et al., 2006).

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. Este ensaio também pode ser efetuado utilizando temperaturas mais altas, avaliando a estabilidade térmica do produto em relação à separação de fases. (PROENÇA et al., 2006).

O teste de estabilidade acelerada tem como objetivo fornecer dados para prever a estabilidade do produto, tempo de vida útil e compatibilidade da formulação com o material de acondicionamento (BRASIL, 2004).

Estes ensaios empregam condições extremas e serve como auxiliar na determinação da estabilidade da formulação. É um estudo preditivo e pode ser usado para estimar o prazo de validade, mas pode ser empregado, ainda, quando houver mudanças na composição ou no processo de fabricação, na embalagem primária ou para validar equipamentos e, também, no caso de fabricação terceirizada. As amostras devem ser submetidas a aquecimento em estufas, resfriamento em refrigeradores, exposição à radiação luminosa e ao ambiente, com controle da temperatura e analisadas em relação aos vários parâmetros de acordo com a forma cosmética estudada (ISAAC, CEFALI, *et al.*, 2008).

Produtos farmacêuticos destinados ao uso tópico devem apresentar características sensoriais agradáveis e ter uma boa espalhabilidade sobre a pele, visando proporcionar o bem-estar dos consumidores e estimular a continuidade do uso (SHIRATA e CAMPOS, 2016). A espalhabilidade é uma medida essencial

para produtos semissólidos, pois esta quantificação faz um acompanhamento das modificações na capacidade que a formulação tem de espalhar ou abranger determinada área (BUGNOTTO et al., 2006).

A forma farmacêutica emulsão tipo O/A apresenta uma série de características essenciais para o sucesso de um medicamento para esse fim, tais como a possibilidade de obtenção de produtos com a desejada consistência, a facilidade com que se espalham sobre a área afetada e sua fácil remoção (FIORATTI., 2005).

O controle de qualidade de um medicamento é de extrema importância, pois garante principalmente sua eficácia, estabilidade, segurança e qualidade, adequando-o ao uso. No caso das emulsões, a espalhabilidade é uma das características importantes a ser determinada, classificando assim a fluidez da emulsão obtida o que permite selecionar a mais adequada. (FIORATTI., 2005).

A eficiência do processo de penetração cutânea depende do veículo utilizado no transporte, os quais devem ser capazes de superar a barreira do estrato córneo (JAIN e PATEL, 2016). Diante disto, o desenvolvimento de formulações que sejam capazes de intensificar a permeação e a possibilidade de transportar através da pele moléculas de elevado peso molecular e diferentes propriedades físico-químicas tem sido um dos grandes interesses da indústria farmacêutica e cosmética (ANDRADE, 2017).

2.6 A pele

A pele é um órgão extenso que recobre o exterior do corpo, variando sua estrutura de um local para outro de acordo com suas funções específicas que incluem: proteção contra agentes externos; termorregulação; sensação (tato, calor, pressão, dor); secreção de lipídios protetores, dentre outras (CHORILI, BRIZANTE e SALGADO, 2007).

É composta de duas camadas principais, a epiderme, derme, e uma terceira camada variável, chamada de hipoderme, que é um tecido subcutâneo e adiposo (Figuras 13 e 14) (SILVA, APOLINÁRIO, *et al.*, 2010).

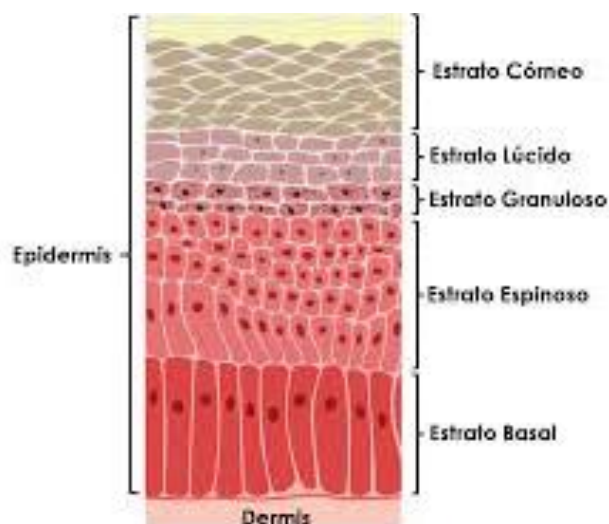


Figura 13: Epiderme. Disponível em <http://indermal.com/?page_id=76>

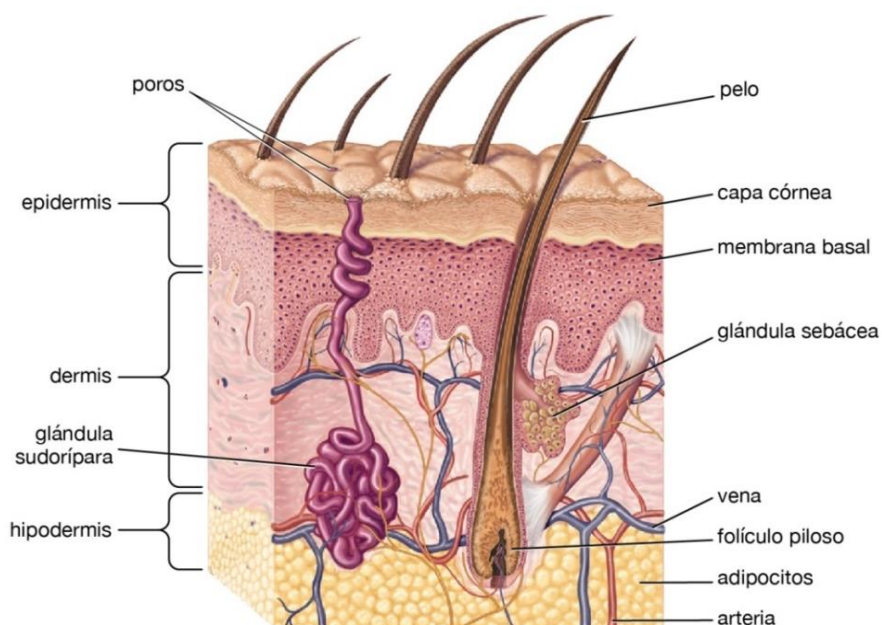


Figura 14: Desenho esquemático da pele, disponível em <<https://escola.britannica.com.br/levels/fundamental/article/pele/482514>>

A epiderme é a camada que protege a pele contra o ambiente externo. Apresenta em sua superfície epitelial externa uma camada de células mortas, queratinosas, que recebe o nome de estrato córneo, o qual funciona como uma barreira eficaz contra microrganismos patogênicos, além de controlar a permeação de componentes pela pele. A invaginação desta camada produz as glândulas sudoríparas, os folículos pilosos e outros apêndices epidérmicos (CHORILI, BRIZANTE e SALGADO, 2007).

A pele constitui a primeira linha de defesa do organismo contra as partículas exógenas, bem como a última barreira que separa o organismo do seu ambiente hostil de agentes patogênicos e tóxicos. Assim, naturalmente, oferece uma baixa permeabilidade associada à elevada resistência ao movimento de moléculas estranhas, sendo, por isso, difícil de penetrar (SOARES, VITORINO e SOUSA, 2015).

Apesar da baixa permeabilidade, a pele funciona como uma via de distribuição terapêutica. A penetração de fármacos, na pele pode se dá pela via intercelular, intracelular ou transpendacial, o que leva a uma ação tópica ou transdérmica (CARVALHO, 2018).

Dentre os benefícios da ação tópica pode-se destacar: é possível direcionar a liberação tópica diretamente para o local em que as células ou tecidos se encontram; é evitado um pico de concentração de fármaco ao nível do plasma; existe uma melhor adesão à terapêutica por parte do paciente (CARVALHO, 2018).

A via transdérmica oferece várias vantagens sobre as formas de dosagem incluindo a duração prolongada da atividade, evitar o metabolismo de primeira passagem pelo fígado, minimização da dor, redução dos efeitos colaterais, redução das flutuações das concentrações de sangue e possível liberação prolongada do fármaco (CARVALHO, 2018).

Além disso, a permeabilidade da pele pode ser influenciada por inúmeros fatores fisiológicos, como a idade, etnia, local anatômico, sexo e algumas patologias, e a administração de fármacos por esta via pode gerar irritação ou sensibilização cutânea (SOARES, VITORINO e SOUSA, 2015).

Sendo a pele uma barreira por excelência, não é, contudo, um órgão isolado, e encontra-se associada a muitos sistemas de órgãos, nomeadamente o sistema musculoesquelético, neurológico, circulatório, endócrino e imunitário (RAFEIRO, 2013).

A pele apresenta pH levemente ácido (4,6 – 5,8), que contribui para que ocorra proteção bactericida e fungicida em sua superfície. Adicionalmente, as

secreções cutâneas apresentam apreciável capacidade tamponante, importante propriedade, uma vez que o pH da pele é freqüentemente alterado em consequência da utilização de produtos tópicos inadequados, expondo a pele a uma série de agentes agressores, em especial microorganismos (LIONARDI, GASPAR e CAMPOS, 2002).

Mesmo peles saudáveis carregam em sua superfície um grande número de microorganismos, principalmente bactérias. Em condições normais, esta microbiota residente protege a pele contra microorganismos patogênicos (ANSARI, 2009).

Apesar das variações nas condições ambientais, a pele é capaz de manter um ecossistema microbiano estável graças ao controle de seu pH e de sua temperatura. É relatado que alterações no pH da pele estão associadas com condições dermatológicas como dermatite atópica, dermatite de contato, acne e infecções por *Candida albicans* (ANSARI, 2009).

Entre os gêneros que são comumente isolados da pele saudável destacam-se: *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Acinetobacter*, *Propionibacteria* e *Brevibactéria*. Já as espécies *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* são transitórias (ANSARI, 2009).

A elucidação de fatores que contribuem para a impermeabilidade da pele tem tornado possível a utilização desta como rota para a liberação controlada de drogas. Basicamente, existem quatro sistemas disponíveis, os quais permitem absorção efetiva de princípios ativos da (BEZERRA. e S.S, 2003).

O primeiro deles, cuja liberação é controlada por partição, consiste em um reservatório de princípio ativo preenchido com uma suspensão saturada deste último num solvente miscível com água e homogeneamente disperso numa matriz constituída por um elastômero de silicone. O segundo tipo seria o matricial, estando neste caso o princípio ativo disperso numa malha de polímero biodegradável, a partir da qual estaria sendo controladamente liberado. O mais

amplamente utilizado é o de permeação controlada através de membranas poliméricas (BEZERRA. e S.S, 2003).

Um quarto sistema, recentemente disponível, é o de gradiente de carga. Adicionalmente, carreadores transdérmicos mais avançados incluem sistemas tais como iontoforético, os géis com viscosidade termo controlada, as pró-drogas e os lipossomas. Muitas drogas têm sido formuladas em sistemas transdérmicos e outras estão sendo analisadas quanto a viabilidade de serem veiculadas em tais sistemas (BEZERRA. e S.S, 2003).

2.7 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As aplicações da cromatografia cresceram de modo explosivo nos últimos cinquenta anos e isto se deve não somente ao desenvolvimento de vários novos tipos de técnicas cromatográficas, mas também à necessidade crescente dos cientistas de melhores métodos para caracterizar misturas complexas.

A cromatografia compreende um grupo diversificado e importante de métodos que permitem ao cientista separar componentes muito semelhantes de misturas complexas. Muitas dessas separações são impossíveis por outros meios. Em todas as separações cromatográficas, a amostra é transportada por uma fase móvel, que pode ser um gás, um líquido ou um fluido supercrítico. Essa fase móvel é então forçada através de uma fase estacionária imiscível fixa, colocada na coluna ou numa superfície sólida. As duas fases são escolhidas de modo que os componentes da amostra se distribuam entre as fases móvel e estacionária em vários graus (SILVA, 2012).

A CLAE é um tipo de cromatografia líquida que utiliza pequenas colunas, enchidas de materiais especialmente preparados e uma fase móvel que é eluída sob altas pressões. Ela tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade (VALENTE, COLLINS e MANFREDI, 1983).

A CLAE é a mais usada de todas as técnicas analíticas de separação. As razões para a popularidade do método são a sua sensibilidade, a fácil adaptação para determinações quantitativas, a sua adequação à separação de espécies não voláteis ou termicamente frágeis e, acima de tudo, a sua ampla aplicabilidade a substâncias de grande interesse para a indústria, para muitos campos da ciência e para o público. Exemplos desses materiais incluem: aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarbonetos, hidratos de carbono, drogas, terpenóides, pesticidas, antibióticos, esteróides, espécies organo-metálicas e muitas substâncias inorgânicas (SKOOG e HOLLER, 2002).

Dentro da CLAE, estima-se que mais de 90% dos laboratórios de análise espalhados pelo mundo utilizam pelo menos um método que aplica a modalidade de CLAE em fase reversa (FR). Sistemas de CLAE-FR consistem em uma fase estacionária de menor polaridade e uma fase móvel de maior polaridade, enquanto a fase normal tem as polaridades invertidas. Estas fases apresentam várias vantagens, tais como: uso de fases móveis menos tóxicas e de menor custo, como metanol e água; fases estacionárias estáveis de muitos tipos diferentes; rápido equilíbrio da coluna após a mudança da fase móvel; facilidade de empregar eluição por gradiente; maior rapidez em análises e boa reprodutibilidade dos tempos de retenção. Além disso, são muito aplicadas à separação de solutos de diferentes polaridades, massas molares e funcionalidades químicas (TONHI, COLLINS, et al., 2002)

2.8 Espectrometria de emissão óptica de plasma acoplada indutivamente (ICP-OES).

A espectrometria de emissão óptica por plasma acoplada indutivamente (ICP OES) é uma ferramenta poderosa para a determinação de multi elementos em uma variedade de matrizes de amostra diferentes. Com esse método, amostras líquidas são injetadas em um plasma de argônio induzido por radiofrequência (RF) usando uma variedade de nebulizadores ou técnicas de introdução de amostras (HOU, AMAIS, et al., 2016).

A névoa da amostra que atinge o plasma é rapidamente seca, vaporizado e energizado através de excitação colisional a alta temperatura. A emissão atômica

que emana a partir do plasma é visto em um radial ou axial configuração, coletada com uma lente ou espelho e fotografada na fenda de entrada de um dispositivo de seleção de comprimento de onda. As medições de elemento único podem ser realizadas de maneira econômica com um simples monocromador fotomultiplicador combinação de tubos (PMT) e multielementos simultâneos.

As determinações são realizadas para até 70 elementos com a combinação de um policromador e um detector de matriz. O desempenho analítico de tais sistemas é competitivo com a maioria das outras técnicas de análise inorgânica, especialmente no que diz respeito ao rendimento e sensibilidade da amostra (HOU, AMAIS, *et al.*, 2016).

A importância do plasma como fonte espectroscópica reside na transferência de energia entre elétrons acelerados e outras partículas. Este processo pode ser efetuado em baixas pressões (tubos fluorescentes), onde os elétrons percorrem uma grande distância antes da colisão com outro átomo. Neste trajeto, o elétron ganha energia do campo magnético para ionizar e excitar o átomo com o qual colide. O átomo excitado decai para o estado fundamental emitindo uma radiação. A amplitude da faixa analítica (4 ordens de grandeza) é uma das principais vantagens do ICP-OES (GINÉ, 1998).

A espectrometria de emissão atômica com plasma vem sendo utilizada no Brasil desde 1976, quando foram instalados os primeiros equipamentos comerciais. A técnica foi muito bem-sucedida em função da capacidade de análises multielementares em diversos tipos de amostras, o que garantiu a sua utilização em laboratórios de química analítica de rotina para as mais diversas aplicações.

A superação da qualidade analítica, devidas às limitações instrumentais, foi acompanhada pelo desenvolvimento de várias montagens óticas, recursos eletrônicos e sistemas de detecção nestes últimos 20 anos. A espectrometria de emissão com plasma é utilizada na indústria metalúrgica, mineradora, agrícola, de alimentos, fertilizantes, do petróleo e inúmeros centros de pesquisas (GINÉ, 1998).

2.9 Análise estatística (Quimiometria)

A Quimiometria envolve a aplicação de métodos matemáticos, estatísticos e computacionais para investigar, interpretar, classificar e fazer previsão de conjuntos de dados de interesse químico, sendo atualmente considerada como uma disciplina da Química e inserida na grade curricular de diversos cursos de graduação e de pós-graduação em universidades brasileiras. (SOUZA. M. S, 2012)

Dentre as diversas subáreas da Quimiometria pode-se destacar o planejamento de experimentos, o reconhecimento de padrões e a calibração multivariada. Na área de planejamento de experimentos busca-se encontrar quais as variáveis que mais afetam um determinado processo, assim como a interação entre elas. No reconhecimento de padrões, a partir de uma vasta gama de informações (medidas químicas ou espectrais, por exemplo) sobre uma série de objetos, pretende-se encontrar agrupamentos de amostras (objetos) que são similares entre si e, assim, detectar tendências nos dados. Na calibração multivariada, busca-se estabelecer um modelo que relacione uma série de medidas (químicas ou espectrais) realizadas em amostras com uma determinada propriedade (concentração, por exemplo). (SOUZA. M. S, 2012).

A análise de componentes principais (*Principal Component Analysis*, PCA) é um dos métodos mais importantes utilizados na Quimiometria e é a base para diversos métodos de reconhecimento de padrões, classificação e calibração multivariada. Normalmente, a PCA é utilizada com o objetivo de visualizar a estrutura dos dados, encontrar similaridades entre amostras, detectar amostras anômalas (*outliers*) e reduzir a dimensionalidade do conjunto de dados (FERREIRA, ANTUNES, *et al.*, 1999).

A PCA consiste em promover uma transformação linear nos dados de modo que os dados resultantes desta transformação tenham suas componentes mais relevantes nas primeiras dimensões, em eixos denominados principais (VASCONCELOS, 2012).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

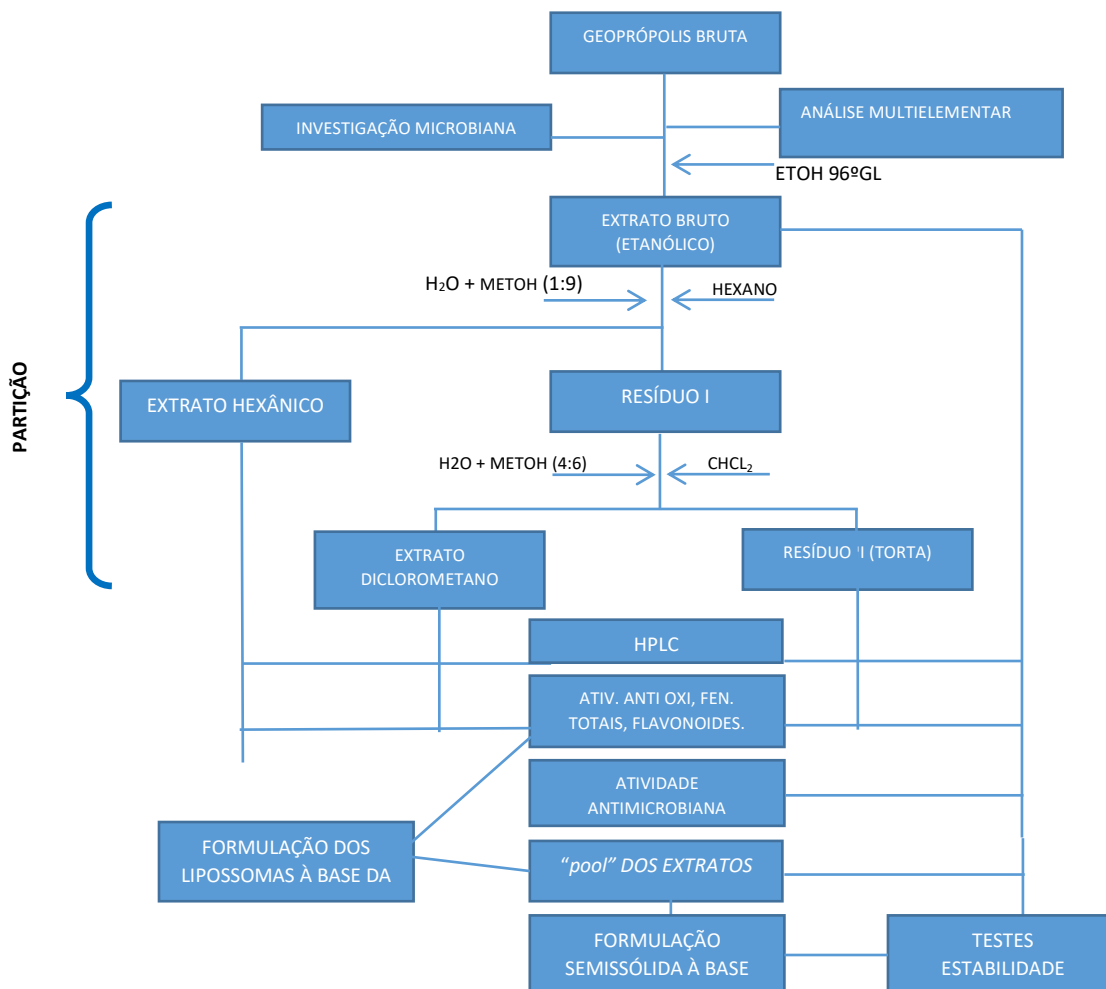


Figura 15: Fluxograma das atividades. Fonte: o autor

Para subsidiar a prospecção tecnológica, foi realizado um levantamento de pedidos de patentes em que o termo “própolis” e “geoprópolis” estivessem citados. A prospecção foi realizada utilizando as palavras chaves “própolis” e “geoprópolis” por meio do mapeamento mundial na plataforma World Intellectual Property Organization (WIPO) – Organização Mundial da Propriedade Intelectual – usando a base de dados PATENTSCOPE que fornece acesso aos pedidos do Tratado de Cooperação Internacional de Patentes (PCT) em formato de texto completo no dia da publicação. A prospecção também foi feita por busca de documentos de patentes nacionais nas bases de dados do Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI).

Os dados coletados na base de dados de patentes foram tratados e discutidos, e assim foi possível traçar um perfil superficial dos países

depositantes, a evolução do número de depósitos nos últimos anos e as principais áreas de aplicação dessas tecnologias.

3.1 Coleta das amostras da geoprópolis

As amostras da geoprópolis elaboradas pela abelha *Melipona quadrifasciata anthidioides* foram fornecidas pelo meliponário do Centro de Agroecologia Rio Seco (CEARIS) localizado na BR-324, km 87, Rodovia Feira-Salvador, Amélia Rodrigues-BA o qual pertence à Universidade Estadual de Feira de Santana-BA (UEFS), (latitude 12°23'08" S / longitude 38°47'51" W).

De acordo com dados do IBGE este meliponário está situado no bioma de Mata Atlântica (Figura 16) com clima classificado como tropical úmido e temperatura anual entre 23 e 35°C. A amostra foi coletada em abril de 2017, por equipe técnica do Centro de Agroecologia seguindo as boas práticas de coleta, acondicionamento e transporte para produtos alimentícios (CODEX-WHO). Por conter impurezas como pedaços de madeira, cera, pólen e até mesmo abelhas mortas, foram realizadas uma série de inspeções macroscópicas com a finalidade de eliminar e purificar as amostras antes da preparação dos extratos.



Figura 16: Origem das amostras da geoprópolis da abelha *Melipona quadrifasciata anthidioides*. Localização do Meliponário do Centro de Agroecologia Rio Seco (CEARIS), no município de Amélia Rodrigues-Ba. Na imagem de satélite, detalhe do alcance aproximado do raio de vôo das campeiras.

Foram coletadas cargas da geoprópolis da abelha *Melipona q. anthidioides* em 10 colônias, aproximadamente 3 kg (Figura 17), e armazenadas em sacos do tipo ziplock hermeticamente fechados, posteriormente, acondicionados em caixa de isopor, com material congelante reutilizável para conservação até o laboratório.

O material obtido foi homogeneizado e armazenado em *freezer* (frost-free) a aproximadamente (-20°C) até o momento dos experimentos.



Figura 17: Coleta da geoprópolis, meliponário do CEARIS - UEFS. Fonte: Autor

3.2 Controle microbiológico da geoprópolis

As análises de controle microbiológico foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia. Foram feitas as contagens para: *Bacillus cereus*, Bactérias aeróbias mesófilas, *Clostridium* sulfito redutor, bolores e leveduras; determinação do Número Mais Provável (NMP) de Coliformes 45°C, *Escherichia coli*, Estafilococos coagulase positiva e pesquisa de *Salmonella sp*, segundo a metodologia preconizada pelo APHA-American Public Health Association - 4ª Edição, 2001 e os padrões microbiológicos para controle de alimentos de origem animal estabelecidos pela Instrução Normativa nº 62 de 26 de agosto de 2003 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2003).

3.2.1 Retirada da unidade analítica

De cada amostra avaliada foram retiradas duas unidades analíticas de 25g, sendo uma para os ensaios gerais e a outra para a pesquisa de *Salmonella*. Antes da retirada das unidades analíticas, o conteúdo de cada amostra foi homogeneizado, para garantir que a porção removida fosse representativa de todo material. No interior da cabine de segurança biológica, as embalagens externas das amostras foram desinfetadas com álcool a 70% utilizando algodão, antes da abertura.

3.2.2 Homogeneização da unidade analítica

Para a homogeneização da unidade analítica foi utilizado o homogeneizador tipo “Stomacher 400” durante dois minutos. Essa primeira homogeneização foi realizada junto com o diluente adequado, representando, portanto, a primeira diluição da análise. Para a dos ensaios gerais, o diluente utilizado foi à água tamponada, enquanto para análise de *Salmonella* foi o Caldo Lactosado, representando, neste último caso, a etapa de pré-enriquecimento para pesquisa desse micro-organismo.

3.2.3 Diluições seriadas decimais

As amostras foram inicialmente submetidas à diluição decimal de 10^{-1} representada pela adição de 225 ml de água tamponada (diluente) a 25 g da amostra. Dessa solução foi retirado 1,0 ml para inocular em tubo contendo 9,0 ml do mesmo diluente, representando a diluição de 10^{-2} . A seguir, transferiu-se 1,0 ml da diluição 10^{-2} , para outro tubo contendo 9,0 ml do mesmo diluente, obtendo-se a diluição de 10^{-3} .

3.2.4 Determinação do número mais provável (nmp) de coliformes

A determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes a 45°C e *Escherichia coli* foi iniciada através do teste presuntivo, onde três alíquotas de 1ml de cada diluição das amostras foram inoculadas em uma série de três tubos contendo Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST), onde foi observada a fermentação da lactose através de turvação e produção de gás nos tubos de Durham após 48h de incubação a 35°C em estufa bacteriológica. Em seguida, a partir dos tubos positivos no teste presuntivo foi realizada a confirmação dos coliformes a 45 ° C, através da transferência de uma alçada de cada tubo, onde ocorreu a turvação com produção de gás, para tubos contendo o meio de cultura Caldo *E. coli* (EC). A observação de crescimento com produção de gás nos tubos de EC, após 48h de incubação a 45,5°C em banho-maria com agitação regulada foi confirmativa da presença de coliformes a 45°C.

Os tubos de EC positivos para coliformes termotolerantes foram estriados em placas de petri contendo Ágar Levine Eosina Azul de Metileno (L-EMB), que é um meio de cultura seletivo diferencial, que tem por objetivo diferenciar a *E. coli* dos demais coliformes termotolerantes. Esse meio foi incubado em estufa bacteriológica regulada a 35°C durante 24 horas, quando então foi verificado se houve o desenvolvimento de colônias típicas de *E. coli*, que são caracterizadas por serem nucleadas com centro preto, com ou sem brilho metálico. Das placas contendo colônias típicas foi transferida uma colônia isolada para tubos de Ágar Padrão (PCA) inclinado, incubados a 35 ° C por 24h. Após a incubação, foram realizados os testes bioquímicos de Citrato, Indol, Vermelho de Metila (VM) e Voges Proskauer (VP).

3.2.5 Contagem de *Bacillus cereus*

A partir das diluições seriadas (conforme descrito no item 3.5.3), com o auxílio de uma pipeta, foram inoculados 0,1 ml de cada diluição na superfície de placas contendo o Agar Manitol Gema de Ovo Polimixina (MYP), previamente preparadas e secas. Em seguida, espalhou-se o inóculo utilizando uma alça de Drigalsky, das placas de maior para as de menor diluição, até que todo o excesso de líquido fosse absorvido pelo meio de cultura. Feito isso, as placas foram incubadas invertidas, a 30 - 32°C, durante 20-24 horas. Após este período, foram selecionadas para a contagem, as placas que continham de 10 a 100 colônias típicas (esféricas, com bordas perfeitas, planas e secas, translúcidas ou levemente creme, rodeadas por um grande halo de precipitação) destas, foram selecionadas 05 colônias típicas para a confirmação, através dos testes bioquímicos de redução do nitrato, utilização anaeróbia da glicose, teste de Voges – Proskauer e teste de decomposição da tirosina.

3.2.6 Contagem de Clostrídios sulfito redutores.

A partir das diluições seriadas (conforme descrito no item 3.5.3), com o auxílio de uma pipeta, foram inoculados 1,0 ml de cada diluição na superfície de placas de petri estéreis, com adição imediata de aproximadamente 15 ml do meio de cultura Agar Sulfito Polimixina Sulfadiazina (SPS), previamente fundido e resfriado a 45°C, homogenizando com suaves movimentos em forma de oito.

Aguardou-se a solidificação do agar e verteu-se sobre o meio outra quantidade de 15 ml do Agar SPS. Aguardou-se a completa solidificação da sobre camada e incubou-se a 46°C durante 18 a 24 horas, em condições de anaerobiose (Jarra de Gaspak com envelope gerador de anaerobiose). Depois do período de incubação, realizou-se a contagem das colônias, selecionando as placas que continham de 20 a 200 colônias suspeitas de Clostrídios Sulfito Redutores, que foram submetidas à coloração de gram, para confirmação do resultado.

3.2.7 Pesquisa de *Salmonella* spp.

A pesquisa de *Salmonella* foi realizada através do método de cultivo clássico de presença e ausência, que é um método bastante sensível, com um limite de detecção de uma Unidade Formadora de Colônia por 25g da amostra (UFC/25g). Esse método, segundo Silva et al. (2010), foi desenvolvido com a finalidade de garantir a detecção de *Salmonella* mesmo em situações desfavoráveis. O procedimento seguiu basicamente quatro etapas que foram aplicadas para todas as amostras. A primeira delas foi o pré-enriquecimento com caldo não seletivo, que teve por objetivo promover a recuperação de células injuriadas. A segunda, o enriquecimento seletivo, através do Caldo Rappaport Vassiliadis Modificado (RV) e o Caldo Tetrionato, que objetivou inibir a multiplicação da microbiota acompanhante e promover a elevação preferencial do número de células de *Salmonella*.

Posteriormente, foi realizado o Plaqueamento seletivo diferencial através da inoculação por estrias em Ágar Hectoen (HE), Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) e Ágar Bismuto Sulfito (WB), que diferenciaram a *Salmonella* através da não fermentação da lactose e da produção de H₂S. A partir daí, as colônias típicas isoladas em cada meio de cultura foram selecionadas e transferidas para as identificações preliminares em Ágar Tríplice Sugar Iron (TSI) e Ágar Lisina (LIA). As colônias típicas em TSI e LIA foram submetidas à confirmação através dos testes bioquímicos de: uréase; indol; malonato; fermentação do dulcitol, lactose e sacarose; vermelho de metila e Vogues Proskauer, citrato e, submetidas aos testes sorológicos somático e flagelar.

3.2.8 Contagem de *Estafilococos* coagulase positiva

A partir das diluições seriadas (conforme descrito no item 3.2.3), com o auxílio de uma pipeta, foram inoculados 0,1 ml de cada diluição na superfície de placas contendo o Agar Baird Parker (BP), previamente preparadas e secas. Em seguida, espalhou-se o inóculo utilizando uma alça de Drigalsky, das placas de maior para as de menor diluição, até que todo o excesso de líquido fosse absorvido pelo meio de cultura. Feito isso, as placas foram incubadas invertidas a 35 - 37°C, durante 45-48 horas. Após este período, foram selecionadas para a contagem, as placas que continham de 25 a 250 colônias típicas (colônias circulares, pretas, pequenas, lisas com bordas perfeitas e rodeadas por uma zona opaca e um halo transparente se estendendo para além dessa zona opaca) destas, foram selecionadas 05 colônias típicas para a confirmação, através do teste da coagulase, com a utilização de Coagulase Plasma-EDTA (plasma de coelho com EDTA).

3.2.9 Contagem de bolores / leveduras e bactérias aeróbias mesófilas

A partir das diluições seriadas (conforme descrito no item 3.2.3), com o auxílio de uma pipeta, para análise dos fungos, foram inoculados 0,1 ml de cada diluição na superfície de placas contendo o Agar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC), que foram incubadas a 25°C, durante 5 dias. Já para as bactérias aeróbias mesófilas, foram inoculados 1,0 ml de cada diluição na superfície de placas de petri estéreis, com adição imediata de aproximadamente 15 ml do meio de cultura Agar Padrão, que foram incubadas a 35°C, durante 48 horas. Após o período de incubação para os dois parâmetros, procedeu-se a contagem das colônias, com o auxílio de um contador de colônias.

3.3 Preparo do extrato e partição química

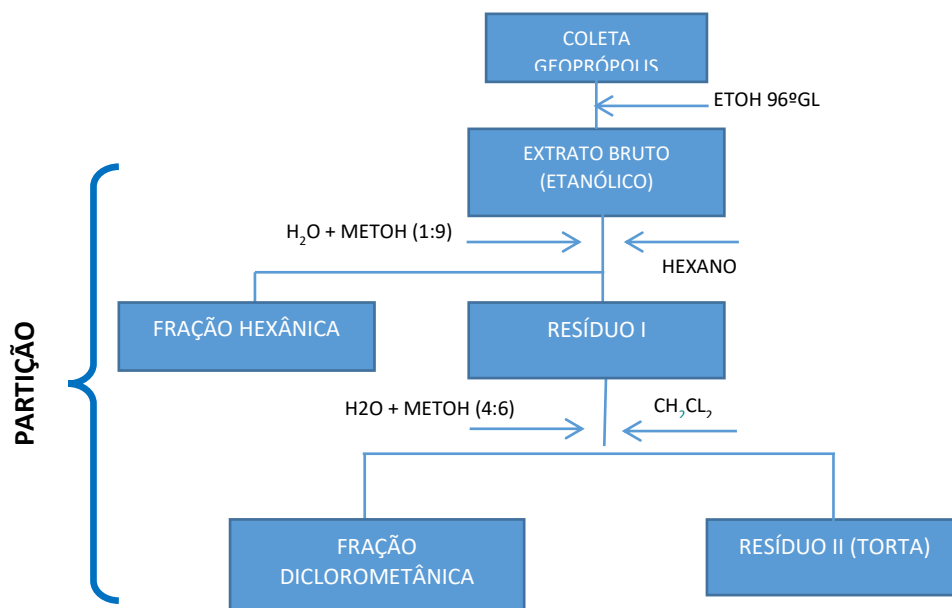


Figura 18: Fluxograma do preparo do extrato e partição química

3.3.1 Preparação do extrato etanólico da geoprópolis.

Os experimentos relacionados com o preparo dos extratos etanólicos e das partições foram realizados no Laboratório de Extração de Produtos Naturais (LAEX) da Unidade Experimental Horto Florestal pertencente à Universidade Estadual de Feira de Santana- UEFS.

As amostras foram inspecionadas retirando-se as impurezas macroscópicas e aproximadamente 5g da geoprópolis foram pesadas em balança analítica. Em seguida os extratos da geoprópolis (EEGP) foram preparados com 50 mL de etanol a 96%. Utilizando-se da técnica Soxhlet (Figura 19) os extratos foram filtrados e concentrados em capela com circulação de ar frio, e posteriormente armazenados em geladeira (4°C) até o momento das análises.



Figura 19: Extrações / filtração /concentração Fonte: autor

3.3.2 Partições hexânica e diclorometânica

Aproximadamente 50mg do extrato bruto seco foi utilizado para a partição química. As frações hexânicas e diclorometânica foram obtidas através da extração em batelada (extração líquido-líquido). O hexano (150 ml) foi adicionado e misturado continuamente na solução (9:1), (90 ml de metanol + 10 ml de água destilada); a mistura foi continuamente agitada cerca de 3x em funil de separação em temperatura ambiente antes de ser concentrado em evaporador rotativo (Gehaka, São Paulo, SP, Brasil) a 40 ° C e evaporado em capela para obter um extrato seco hexânico (Figura 20).



Figura 20: Extrato etanólico e suas partições, diclorometânica e hexânica Fonte: autor

O Material foi armazenado no refrigerador a 4°C até o preparo analítico para realização das análises no HPLC.

3.4 Método cromatográfico

3.4.1 Padrões de Reagentes

A realização do método analítico em HPLC foi executada no Laboratório de Bioprospecção de Vegetais da UEFS (LABIV). Nas análises de HPLC foram utilizados os solventes: metanol (Sigma-Aldrich®) grau HPLC, ácido acético (Vetec®) reagente de grau analítico, e água purificada em sistema Milli-Q® a 18,2 MΩcm.

Foram utilizados padrões de ácido trans-ferúlico, artepelim-C, campferol, propilgalato, ácido gálico, p-cumárico, ácido cafeico, catequina, campferide, quercetina, naringenina, aurapteno, vanilina, rutina e ácido clorogênico, todos na concentração de 1mg/ml.

3.4.2 Corrida Cromatográfica e obtenção dos espectros

Para a análise Cromatográfica Líquida de Alta Eficiência (CLAE) ressuspendeu-se 5 mg dos extratos etanólicos, de suas frações (hexânica, diclorometânica) e do resíduo (torta) em 1 ml de metanol grau HPLC. Os preparados foram pré-concentrados em cartucho C18 e filtrados em membrana Millipore® 0.2 µm (Figuras 21 e 22) antes de serem submetidos a injeção no (HPLC) acoplado a um detector de matriz de diodos.



Figura 21: Cartucho C18 e filtração em membrana Millipore Fonte: autor

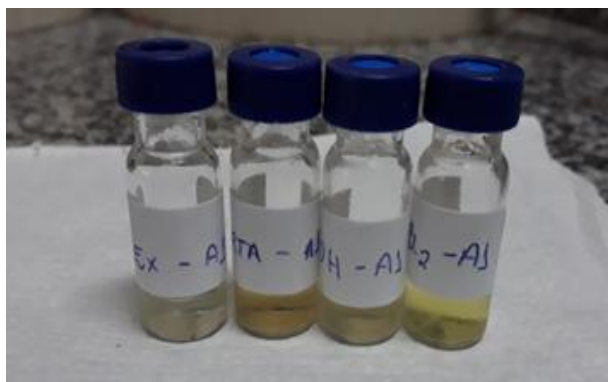


Figura 22: Extrato etanólico, partições hexânica, diclorometânica e resíduo "torta" Fonte: autor

Em cada análise o volume de 20 μL na concentração (5 mg/mL) foi injetado no HPLC (Varian Polaris) Modelo 320 SERIAL N 01763, conectado em linha com um detector de arranjo de diodos (DAD) (220– 600 nm) o mesmo estava equipado com uma coluna Purospher® STAR - RP -18 endcapped LiChroCART® 75-4 (150mm \times 2.2mm diâmetro interior, 3,0 μm) (Figura 23).



Figura 23: Equipamento HPLC (Varian Polaris) Modelo 320 SERIAL N 01763 Fonte: autor

O gradiente de eluição consistiu em uma fase aquosa (A) e uma fase orgânica (B metanol) que foram previamente filtradas sob vácuo em membrana Millipore® 0.2 μm . A fase aquosa foi preparada uma solução com 1 % de ácido acético. A eluição começou nas seguintes proporções: 0 a 3min, 95 % A e 5% B, 3 a 5 min, 80% A e 20% B de 5 a 10 min 70% A e 30% B de 10 a 20min 55% A e 45% B de 20 a 30min 20% A e 80% B.

A corrida cromatográfica perdurou 41 minutos e o gradiente foi seguido por lavagem e condicionamento da coluna. A velocidade de fluxo foi de 1 ml/min.

3.5 Determinação de multi elementos na geoprópolis

3.5.1 Reagentes e soluções

Toda vidraria, tubos de polipropileno e materiais diversos foram descontaminados em um banho de ácido nítrico a 10% (v / v) por um período mínimo de 24 h, lavados com água deionizada e secos à temperatura ambiente. Um sistema de purificação Milli-Q de água destilada ultrapura (Millipore - Bedford, MA, EUA) foi utilizado para preparar soluções.

Os produtos químicos e reagentes utilizados em todos os procedimentos foram da Merck® (Darmstadt, DA, Alemanha), com grau analítico, exceto quando indicado. HNO₃ 65% (m / m) grau Suprapur e H₂O₂ 30% (m / m) foram utilizados para digestão da amostra. Soluções multielementares foram preparadas para macroelementos (com uma concentração de 500 mg/L) e microelementos (com uma concentração de 20 mg / L) a partir de soluções de monoelementos SpecSol® (São José dos Campos, SP, Brasil) contendo 10.000 mg/L de Na; 4.000 mg/L de Ca, K, Mg e P; e 1000 mg / L de Al, As, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, Se, Si, Sn, Sr, V e Zn. Para avaliação do teor de carbono orgânico dissolvido (% DOC) na amostra digerida, uma solução de referência de 20.000 mg/L em carbono foi preparada a partir de ácido cítrico J.T. Baker®, Upper Saucon Township (Pensilvânia, EUA).

3.5.2. Instrumentação

As determinações dos diversos elementos foram realizadas no Núcleo de estudos ambientais (NEA) do Instituto de geociências da UFBA, usando um espectrômetro de emissão óptica de plasma acoplado indutivamente simultâneo (ICP-OES) Agilent 700 series (Figura 24), com visualização axial e um detector de estado sólido de carga acoplada (CCD) que permite medições de (167 a 785 nm). Uma câmara Sturman-aster e um nebulizador VGroove também foram utilizados.



Figura 24: Espectrômetro de emissão óptica de plasma acoplado indutivamente (ICP OES) agilent 700 series. Fonte: https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/8510230100_700SeriesICP_UserManual.pdf

As determinações dos multi elementos foram realizadas sob condições recomendadas pelo fabricante para potência de (1,3 kW), fluxo de plasma e gás auxiliar (15,0 L / min) e fluxo de gás do nebulizador (0,7 L / min). As linhas espectrais foram selecionadas de acordo com os critérios de ausência de interferências espectrais e sensibilidade adequada para a determinação dos elementos. Foram utilizadas as seguintes linhas de emissão (I e II para linhas de emissão atômica e iônica, respectivamente): Al (I) 396.152, As (I) 193.696, Ba (I) 455.403, Ca (II) 422.673, Cd (I) 226.502, Co (I) 228.615, Cr (II) 205.560, Cu (I) 324.754, Fe (II) 238.204, K (II) 766.491, Mg (II) 285.213, Mn (II) 257.610, Mo (I) 202.032, Na (II) 588.995, Ni (II) 216.555, P (II) 213.618, Pb (I) 220.353, Sb (I) 206.834, Se (I) 196.026, Si (I) 288.158, Sn (I) 283.998, Sr (I) 407.771, V (I) 311,837 e Zn (I) 213,857 nm. (JÚNIOR, MATOS, *et al.*, 2017).

3.5.3 Procedimento de digestão

As análises da digestão das amostras foram realizadas no Departamento de Ciências da Vida e Departamento de Ciências Exatas e da Terra, da Universidade do Estado da Bahia, UNEB, Salvador-BA, Brasil.

A digestão ácida das amostras da geoprópolis foi realizada em forno de microondas comercial de alta pressão (Milestone Ethos 1600 Microwave Labstation - Sorisole, LM, Itália) na frequência de 2450 Hz e saída de energia de 900 W. Esse processo de digestão ocorreu em um sistema contendo um recipiente de tetrafluorometoxi de 100mL e um revestimento de cerâmica. A temperatura e pressão máximas de operação foram de 180 °C, 1000 W e 100 bar, respectivamente, em 30 minutos.

O procedimento de digestão úmida auxiliado por radiação de microondas (MW) foi proposto para analisar as amostras (JÚNIOR.,2017). Aproximadamente 300 mg de cada amostra da geoprópolis foram inseridas diretamente em um vaso fechado específico para microondas (frascos de politetrafluoretileno) e 7,0 mL de HNO₃ 65% HNO₃ (m / m) + 1,0 mL de H₂O₂ a 30% (m / m) foram adicionados a cada recipiente. O programa de aquecimento foi realizado em quatro etapas sucessivas (Tabela 4).

Tabela 4: Condições operacionais de um sistema de digestão por microondas de amostras da geoprópolis em forno de microondas com cavidade.

Estágios	Tempo/Min	Potência máxima / W	Temperatura/ °C	Pressão / bar
1	6	750	90	35
2	4	750	90	35
3	8	1000	180	35
4	15	1000	180	35
Ventilação	20	0	-	-

3.5.4 Determinação do carbono residual das digestões.

Após o procedimento de digestão e subsequente resfriamento, as amostras digeridas foram diluídas com água deionizada para um volume final de 15,0 mL (micro) e 50,0 mL (macroelementos). O branco foi preparado em cada lote de amostras. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. As soluções resultantes foram analisadas pelo ICP OES. A eficiência da digestão foi avaliada pela determinação do teor de carbono residual (CCR) na amostra digerida no ICP OES a 193.027 nm (GOUVEIA, 2001).

3.5.5 Validação analítica

A validação do procedimento foi realizada de acordo com as diretrizes da Conferência Internacional de Harmonização (ICH, 2005) por parâmetros de desempenho: limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), precisão e exatidão. Além disso, foi realizado um estudo de interferência (efeito matriz).

LOD e LOQ de cada analito foram calculados como a concentração de analito que correspondia a três e dez vezes, respectivamente, o desvio padrão de dez medições independentes do branco, divididas pela inclinação da curva de calibração. Para a avaliação da exatidão e da precisão, folhas de espinafre foram utilizadas como material de referência certificado 1570a (CRM 1570a) do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (Gaithersburg, MD, EUA) mais adição (10 µg de Ca, K, Mg, Na e P e 5 µg para outros analitos) e a recuperação do analito nas amostras foram usadas. A precisão foi avaliada e valores de desvio padrão relativo (RSD) inferiores a 10% indicaram a boa precisão desse método. Além disso, para estudar o efeito da matriz, uma curva de calibração externa foi

preparada em ácido diluído (3 mol / L HNO₃), a mesma concentração de ácido obtida na amostra após a digestão e as intensidades de emissão foram medidas pelo ICP OES. A razão de inclinação entre as curvas de calibração foi usada para verificar a ausência ou presença do efeito da matriz. Soluções branco analíticas foram preparadas para avaliar a qualidade dos reagentes durante a análise.

3.6 Determinação do potencial antioxidante total pela captura do radical livre DPPH

Os experimentos foram realizados nos Laboratório de Pesquisa e Análise de Alimentos e Contaminantes - LAPAAC FAR/UFBA. A metodologia utilizada foi descrita por (BRAND-WILLIAMS, CUVELIER e BERSET, 1995.) O método baseia-se na transferência de elétrons onde, por ação de um antioxidante (AH) ou uma espécie radicalar, o DPPH que possui cor púrpura que absorve em um comprimento de onda de 517 nm e é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorvância.

A partir dos resultados obtidos determinou-se a porcentagem de atividade antioxidante ou seqüestradora de radicais livres. A técnica foi adaptada de (FIRMINO, 2015).

3.7 Fenólicos totais

A quantificação dos compostos fenólicos totais foi realizada, em triplicata, através do método espectrofotométrico utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu (marca comercial Merck), incluindo ácido gálico como padrão de referência. Os resultados foram expressos em miligrama (mg) de ácido gálico (marca comercial Sigma) equivalentes a quantidade em grama (g) de peso seco do extrato do geoprópolis (mg Ec/g) (Singleton & Rossi, 1965). A quantificação do teor de fenólicos totais foi realizada através de uma curva de calibração construída pela diluição de uma solução padrão de ácido gálico. A partir equação da reta ($y = 0,01358x - 18,157$) foi possível avaliar o teor de compostos fenólicos totais, expresso em mg de ácido gálico equivalente por 100 g de extrato (gEAG.100g).

Para tal foi utilizado um balão volumétrico de 10mL, no qual foi adicionado sequencialmente 4mL de água destilada, 1mL da amostra, 0,3mL de nitrito de sódio 5%, após 5 minutos adicionou-se 0,3mL do cloreto de alumínio 10%, após 1 minuto adicionou-se 2mL de hidróxido de sódio 1M. Completou-se o volume do balão com água destilada e homogeneizou-se manualmente. A absorbância foi medida a 510nm (FIRMINO, 2015).

3.8 Determinação de Flavonoides Totais

Utilizou-se o equipamento Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer (Figura 25) com as seguintes características (tabela 5):

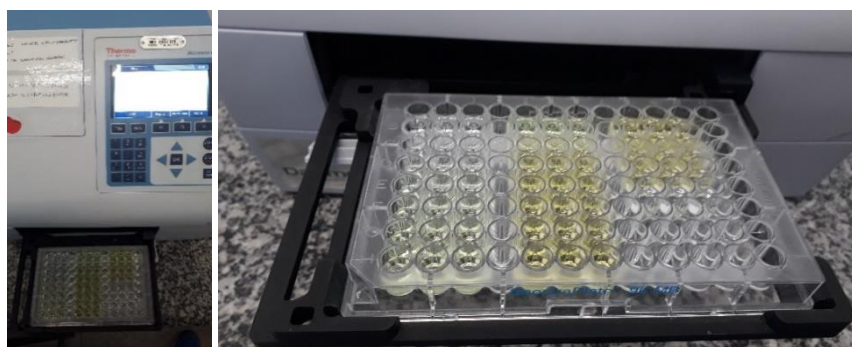


Figura 25: Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer , Fonte: autor

Tabela 5: :Características do espectrofotometro

Precisão	1.0% + 0.003 Abs (0-2.0 Abs); 2% (2.0-2.5 Abs) at 450nm
Profundidade métrica	43cm
Velocidade de medição	6 segundos com placa de 96-poços
Seleção do comprimento de onda	Monocromador
Fonte de luz	Xenon Flash lamp
Precisão	SD<0.003 Abs or CV<0.5% at 450nm (modo de precisão); SD<0.003 Abs or CV<1% at 450nm (modo rápido)
Peso métrico	10.8kg

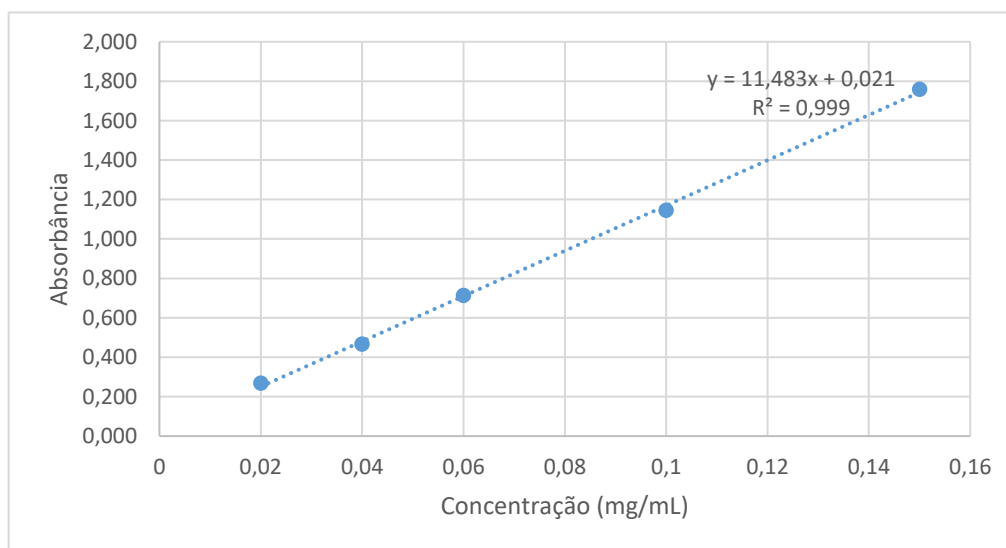
A quantificação de flavonoides totais foi realizada através da preparação da curva de calibração no qual utilizou-se uma solução estoque de quercetina padrão (Sigma-Aldrich) 1mg/mL. A partir da solução estoque, foram preparadas diluições em triplicatas nas concentrações de 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,15 e 0,2 mg/mL, que reagiram a solução de cloreto de alumínio 2% (p/v), completando-se o volume com metanol, em balão volumétrico de 10 mL. Após agitação, aguardou-se 10 min de repouso e realizou-se a leitura das absorbâncias no espectrofotômetro ELISA em 425 nm. Utilizou-se como branco o

metanol acrescido da solução de cloreto de alumínio 2% (p/v). Com os dados obtidos construiu-se a curva de calibração de flavonoides totais equivalentes em quercetina, por meio destes avaliou-se a linearidade, obtendo-se a equação da reta e o coeficiente de correlação linear

A partir da construção da curva de calibração para flavonoides totais, obtém-se a equação da reta ($y=11,483x+0,021$ / R^2 0,999) e substituindo pelos valores médios das absorbâncias de cada amostra, encontrou-se a real concentração de flavonoides totais em cada amostra analisada expresso em QE g/ 100 g de extrato.

No gráfico 1 é possível observar a curva de calibração utilizada no doseamento de flavonoides totais. No intervalo de concentração que variaram de 0,02mg/mL-0,2mg/mL de quercetina a metodologia analítica apresentou linearidade de resposta. A equação da reta e o coeficiente de correlação linear foram obtidos por meio do tratamento estatístico da regressão linear, utilizando os valores obtidos das absorbâncias e das concentrações das amostras.

Gráfico 1: Curva de calibração para flavonoides totais equivalentes em quercetina



3.9 Atividade antimicrobiana

3.9.1 Preparo e obtenção do inóculo microbiano

Os experimentos desta seção foram auxiliados pela estudante do curso de Biotecnologia da UFBA, Tainara Santos de Sena como requisito de atividade de

bolsista PIBIC 2020.1, em projeto intitulado “Potencial antimicrobiano da geoprópolis coletado no Recôncavo Baiano” sob orientação da Prof^a Dr^a Lília Ferreira de Moura Costa e minha participação como tutor.

Para a realização da pesquisa foram utilizadas cepas de referência (American Type Culture Collection - ATCC) de microrganismos de interesse clínico, fornecidas pelo Laboratório de Microbiologia Aplicada a Biotecnologia e Imunologia (LAMABI) localizado no Instituto de Ciências da Saúde (ICS) da Universidade Federal da Bahia (UFBA) e da Faculdade de Farmácia da UFBA. As bactérias escolhidas para estudo foram (1) uma Gram negativa e (1) uma Gram-positiva, respectivamente: *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Para a reativação das cepas, inicialmente mantidas em conservação, foi utilizada a técnica de estriamento em placa com o meio de Ágar Mueller-Hinton, onde, posteriormente foram incubadas à uma temperatura de 36°C, durante 24 horas. Após as 24 horas as colônias foram transferidas para mesmo meio líquido, preparado conforme as instruções do fabricante. O meio Mueller-Hinton apresenta uma melhor reprodutibilidade entre lotes nos testes de sensibilidade a antimicrobianos e produz crescimento satisfatório da maioria dos patógenos.

3.9.2 Antibiograma

O antibiograma foi realizado com base na metodologia proposta por Kirby-Bauer (1966), recomendada mundialmente para a determinação da sensibilidade a antibacterianos através da difusão de discos em ágar. Foram preparadas placas contendo meio de cultura Ágar Mueller-Hinton, recomendado para a realização de antibiograma segundo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). As colônias bacterianas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus* foram previamente suspensas em solução salina para se obter uma turvação compatível com a escala 0,5 de Mcfarland (1×10^6 UFC/ml). Em cada placa foi semeada uniformemente as bactérias de interesse com o auxílio de um swab embebido da suspensão bacteriana. Em seguida os discos contendo o antibiótico de primeira escolha gentamicina referenciado pela NCCLS para cada cepa foram inoculados na superfície de cada placa juntamente com discos contendo o extrato etanólico da geoprópolis da abelha *Melipona quadrifasciata anthidioides*. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 36°C por 18 a 24 horas de acordo com o

tempo de incubação indicado para cada microrganismo. Para análise, o diâmetro do halo inibitório de cada disco foi medido com auxílio de um paquímetro e os resultados foram classificados em resistente (R), intermediário (I) ou sensível (S) de acordo com uma tabela padrão do CLSI para o antimicrobiano testado.

3.9.3 Teste de microdiluição em caldo

O método de microdiluição em caldo permite medir qualitativamente e quantitativamente a atividade *in vitro* de um agente antimicrobiano de interesse contra um determinado isolado bacteriano. Esse ensaio foi realizado seguindo a norma M7-A9 vol. 32 nº 2 da “Metodologia dos testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico” do National Committee for Laboratory Standards (NCCLS). Os resultados permitiram determinar a concentração inibitória mínima (CIM), menor concentração de um agente antimicrobiano que impede o crescimento visível de um microrganismo em testes de sensibilidade por diluição e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) que corresponde à concentração mínima do agente antimicrobiano capaz de causar morte bacteriana.

Os testes de sensibilidade são indicados para qualquer organismo que contribua para um processo infeccioso que justifique terapêutica antimicrobiana, sempre que sua sensibilidade não possa ser predita de maneira confiável a partir do conhecimento da identidade do organismo. São indicados com maior frequência quando o microrganismo de interesse apresenta resistência aos agentes antimicrobianos geralmente usados. A categoria de interpretação do teste de sensibilidade antimicrobiana classifica também em: sensível (S), intermediária (I) ou resistente (R), baseado na resposta *in vitro* de cada microrganismo para determinado antimicrobiano. O ensaio foi realizado em placas de 96 poços de fundo redondo. As concentrações do extrato etanólico da geoprópolis utilizadas para o teste foram respectivamente: 250 mg/mL, 200 mg/mL, 150 mg/mL, 100 mg/mL, 80 mg/mL, 50 mg/mL e 25 mg/mL. Em cada poço conteve as concentrações variadas do extrato da geoprópolis, 30µL do inóculo bacteriano, 20µL do reagente cloreto de 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-feniltetrazolium (INT) e o restante completado com o meio Mueller-Hinton. No controle positivo (CP) foi empregado o inóculo bacteriano, o reagente INT e meio Mueller-Hinton; e no

controle negativo (CN) o reagente INT e meio Ágar Mueller-Hinton, sem adição do inóculo bacteriano. Os ensaios foram realizados em quadruplicata para cada cepa bacteriana (Figura 26).

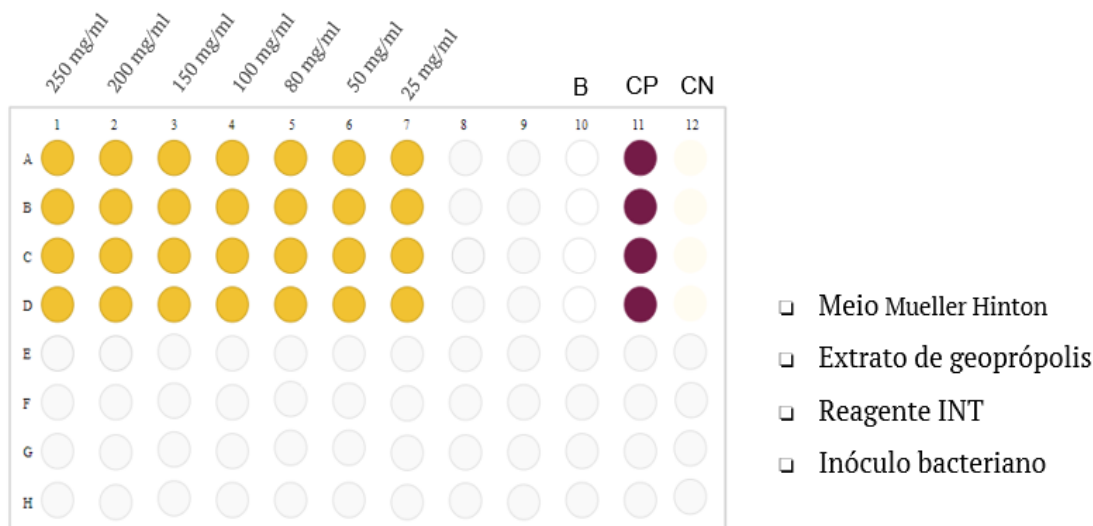


Figura 26: Esquema da microdiluição em caldo, de acordo com “Metodologia dos testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico” do National Committee for Laboratory Standards (NCCLS) / CP: controle positivo/ CN: controle negativo/ B: branco

Ao final da preparação das placas, estas foram envolvidas por filme respirável e incubadas em uma estufa bacteriológica a 36°C por 24 horas. A leitura de cada placa foi realizada pela observação do crescimento bacteriano a olho nu e utilizando um espectrofotômetro para Elisa, modelo Multiskan Go, o qual pode ser aplicado quando são utilizados indicadores de crescimento coloridos de acordo com os métodos de leitura do CLSI. Uma alíquota de cada poço da placa, nas concentrações variadas foi retirada e inoculada em placas contendo meio Ágar Mueller-Hinton, espalhados com auxílio de uma alça de Drigalski e incubados durante 24h para verificar se houve crescimento bacteriano. A menor concentração que não apresentou crescimento bacteriano foi classificada como Concentração Bactericida Mínima (CBM).

3.10 Formulação do Pluronic Lecithin Organogel (PLO) à base do EEGP (5%)

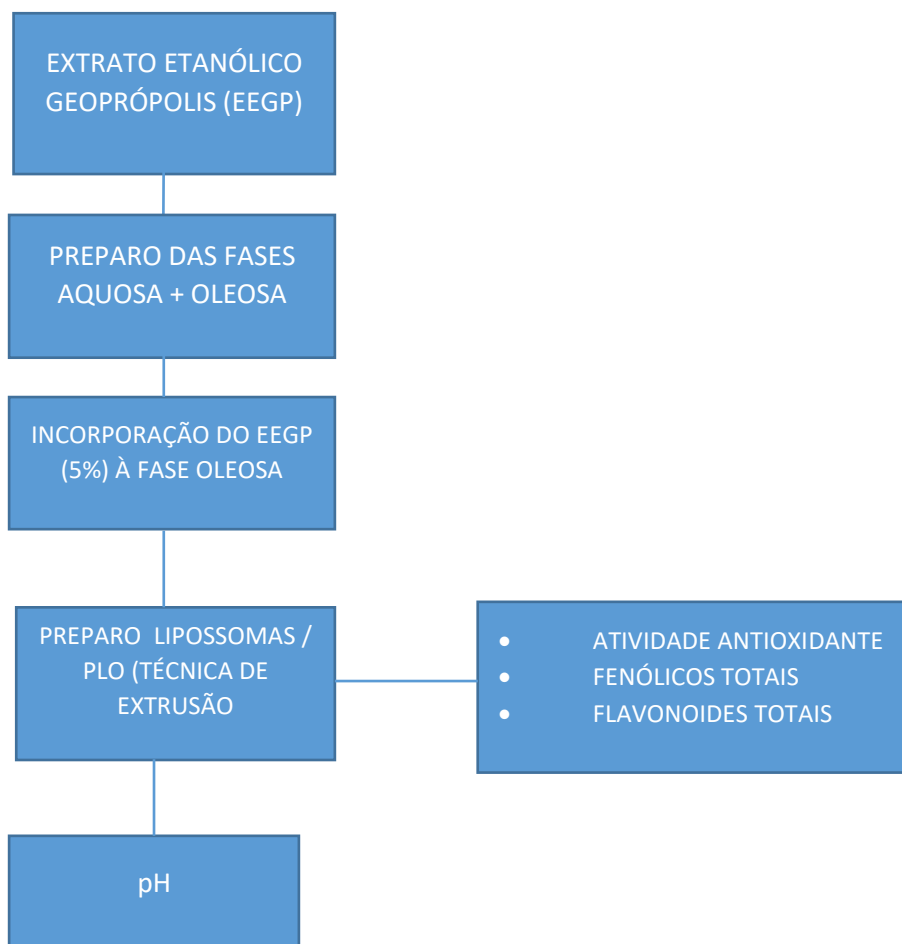


Figura 27: Fluxograma do processo de formulação do organogel PLO-EEGP (5%)

A formulação do organogel, bem como as análises de pH foram realizadas no Laboratório de Farmacotécnica da Faculdade de Farmácia da UFBA. As fases aquosas e oleosa foram previamente preparadas, e foram formuladas com 5 % do EEGP. A fase oleosa foi preparada com a dissolução da lecitina de soja granulada e do palmitato de isopropila, deixando a em repouso durante 12 horas em temperatura ambiente para garantir a dissolução completa. A fase aquosa foi preparada por dispersão da quantidade pesada de Polaxamer 407 em água fria. A dispersão foi armazenada em refrigerador para dissolução efetiva do Polaxamer 407. A composição da formulação está resumida na (tabela 6).

Tabela 6: Composição da formulação PLO-EEGP 5%

Fase	Componentes	Cc (m/v)
aquosa	Polaxamer 407	20%
	Água purificada	q.sp. 100,0%
oleosa	Lecitina de soja + palmitato de isopropila	22,0%
	ácido sórbico	
	(EEGP)	5,0%

Fonte: autor

O experimento foi realizado objetivando-se conhecer o comportamento do EEGP 5% na formulação que foi previamente dissolvido em fase oleosa, e incorporado à fase aquosa através da força de extrusão, fornecida por duas seringas do tipo laeur lock conectadas por um adaptador (Figura 28).

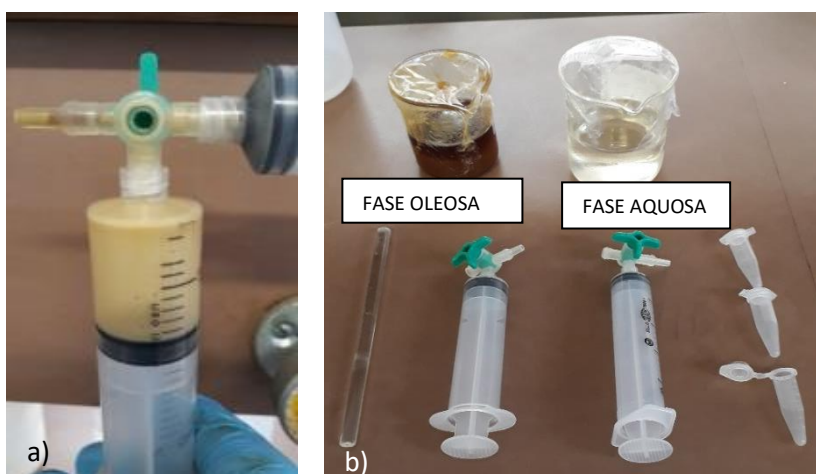


Figura 28: a) Detalhe das seringas Lauer lock conectadas, b) Fases oleosa e aquosa / Material utilizado no processo de extrusão/ Fonte: autor

Misturou-se o conteúdo das duas seringas, com aplicação da pressão alternadamente nos êmbolos no mínimo por 110 vezes, resultando no organogel. Após o preparo o pH foi verificado por 21 dias através do método colorimétrico utilizando o Universalindikator (0-14) MERCK. Observou-se o preparado no Olympus optical model CX40RF100- Objetiva de 40x e 100x. Também foram realizados os testes de potencial antioxidante e teor de compostos fenólicos totais e flavonoides totais após o produto preparado.

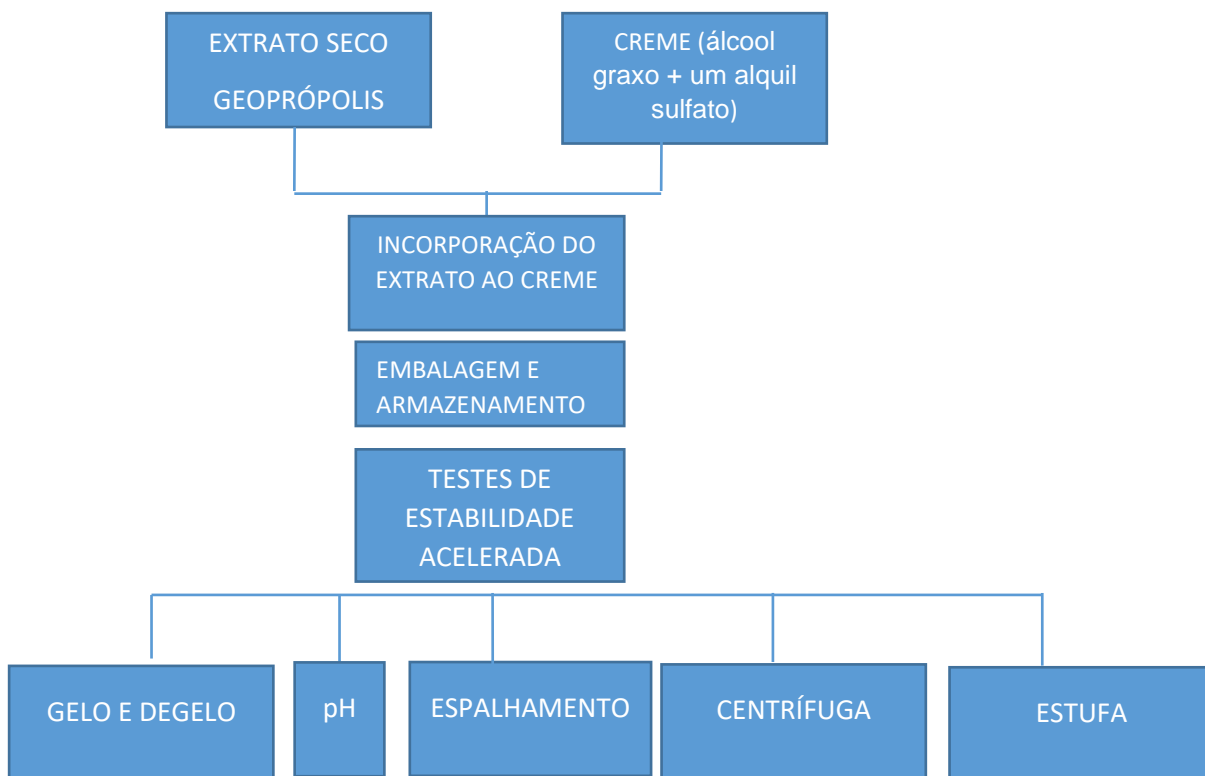


Figura 29: Fluxograma do processo de formulação da base semissólida (creme).

3.11 Formulação do creme à base de extrato hidroalcolico da geoprópolis

Para a incorporação do extrato da geoprópolis da *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Figura 30), preparado anteriormente, selecionou-se uma base do tipo emulsão óleo em água (OVA), inscrita no Formulário Nacional da Farmacopeia Brasileira, descrita como uma forma farmacêutica semissólida com viscosidade de creme sendo utilizada, normalmente, para aplicação externa na pele ou nas mucosas à base de uma mistura de 90 partes de álcool graxo e 10% de tensoativo aniônico (cera auto-emulsionante, Lanette® N), além de conservantes antimicrobianos, emoliente, umectante e água purificada."possibilitando sua utilização em fabricação de cremes e loções (BRASIL, 2012).



Figura 30: Extrato Etanólico da Geoprópolis (EEGP) seco, utilizado na incorporação à base semissólida (Fonte:autor)

Esta formulação farmacêutica, bem como, os testes de estabilidade acelerada, foram realizados no Laboratório de Pesquisa de Medicamentos e Cosméticos (LAPEMEC), da Faculdade de Farmácia da UFBA.

A emulsão constituída por álcool graxo e um alquil sulfato, foi preparada de maneira corriqueira fundindo separadamente a fase O (oleosa) e a fase A (aquosa). A formulação estabelecida (tabela 7) foi elaborada a partir do preparo das fases aquosa e oleosa.

Tabela 7: Formulação do creme utilizado como base para incorporar o extrato da geoprópolis

FASE OLEOSA			FASE AQUOSA		
Componentes	Função	Quantidade	Componentes	Função	Quantidade
Cera auto-emulsionante (Lanette® N)	emulsionante	12,0%(m/V)	glicerina	umectante	2,00%
Propilparabeno (Nipazol®)	conservante	0,05%(m/V)	Metilparabeno (Nipagin®)	conservante	0,08%
Óleo mineral	emoliente	3,0%(V/V)	Água destilada	veículo	q.s.p

Fonte: (autor)

Em um béquer foi disposta a fase oleosa com 12,0% de cera auto-emulsionante (Lanette® N), 3,0% de óleo mineral e 0,05% de propilparabeno (Nipazol®) que foi levado ao banho de água a 75°C para se fundir. Enquanto em outro béquer foi preparada a fase aquosa com água destilada / q.s.p., 0,08% de metilparabeno (Nipagin®) e 2,00% de glicerina, logo após levada para chapa de aquecimento a 80°C quando as fases atingiram as mesmas temperaturas e foram homogeneizadas, verteu-se a fase aquosa na fase oleosa, sob agitação constante e no mesmo sentido. O extrato hidroalcolico foi incorporado à fase oleosa. Manteve-se agitação de 400rpm até resfriamento e formação do creme; o produto foi deixado em repouso por 24 horas, tampado e em condições ambientais (ZANIN, MIGUEL, *et al.*, 2001).

Este procedimento resultou na base semisólida (creme) desejada. A tabela 8, mostra as diferentes concentrações de extratos da geoprópolis incorporados na base (creme) obtida, além da formulação controle sem qualquer extrato adicionado. As preparações foram acondicionadas em recipientes plásticos opacos e devidamente identificadas.

Tabela 8: Diferentes concentrações de extratos da geoprópolis incorporados na base (creme) obtida.

Amostras	% EEGP ¹
1	0%
2	1,5%
3	2,5%
4	5,0%

Proporções em % referente as formulações elaboradas. Fonte: autor

3.11.1 Embalagem e armazenamento da formulação

As amostras para teste de estabilidade foram identificadas e acondicionadas em recipientes plásticos opacos durante o período que compreendeu os testes de estabilidade (90 dias). Ao final deste trabalho foram desenhadas sugestões de layout para embalagens primária e secundárias, além de sugestão de bula para este produto (APÊNDICES O, P, Q, R, S, T, U).

3.11.2 Testes de estabilidade acelerada

As amostras foram submetidas a estudos de estabilidade acelerada de acordo com os procedimentos descritos no Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos (ANVISA, 2004). Utilizou-se 0,45g do creme formulado em cada avaliação (1,5%), (2,5%) e (5,0%). A adição de pesos de 297,6g, 395g, 492,8g, 597,9g, 791,5g, 999,7g e 1205,09g. a cada dois minutos, na placa superior, promoveu o espalhamento do produto, que pôde ser medido como extensibilidade, em centímetros. Avaliou-se o pH e a espalhabilidade no período de 24 horas, 30 e 90 dias após a produto formulado.

3.11.3 Centrífuga

Para tanto, as formulações semissólidas (cremes) foram testadas quanto a sua homogeneidade através da técnica de centrifugação. Em um tubo de ensaio utilizado em centrífuga, cônico, graduado, de 10 g de capacidade, foram pesados, em balança semi-analítica, cerca de 5 g do creme à base da geoprópolis e foram submetidas a rotações de 3000 rpm, em centrífuga, durante trinta minutos, à temperatura ambiente (21°C) (ANVISA, 2004).

3.11.4 Gelo e degelo

As formulações do creme incorporados do EEGP (1,5%), (2,5%) e (5,0%) foram submetidas a um ciclo de 6 dias alternados de gelo e degelo, logo 3 dias

em gelo e 3 dias em degelo. Os ciclos de congelamento e descongelamento alternaram 24 horas em temperaturas baixas (-6° C) e 24 horas em mais elevadas (21 °C).

3.11.5 Estufa

As formulações do EEGP (1,5%), (2,5%) e (5,0%) foram submetidas a um ciclo de 6 dias alternados na estufa, logo 3 dias passaram em temperatura ambiente (21°C) e 3 dias em estufa a 45°C. Os ciclos de estufa e temperatura ambiente alternaram 24 horas em temperaturas mais baixas (21° C) e 24 horas em mais elevadas (45 °C).

3.11.6 pH

O monitoramento do pH foi realizado no período de 24 horas, 30 e 90 dias após o preparo das formulações. Determinou-se o pH por meio de técnica potenciométrica, com auxílio de phmetro de bancada com pH previamente calibrado na faixa de 4,0 e 7,0. As análises foram realizadas em triplicata.

3.11.7 Espalhabilidade

A espalhabilidade foi realizada antes e após os ciclos de gelo/degelo e estufa.

Para a determinação da espalhabilidade in vitro utilizou-se a metodologia descrita por Knorst (1991), que se utiliza de placas de vidro sobrepostas que sobre uma escala de papel milimetrado determina a superfície que a amostra abrange através da medição dos diâmetros perpendiculares, com posterior cálculo do diâmetro médio. A espalhabilidade (E_i) expressa em mm², a 24± 2 °C foi calculada a partir da equação:

$$E_i = [(d^2) \cdot \pi] / 4$$

Considerando-se como E_i (mm²) a espalhabilidade da amostra para peso i e d o diâmetro médio (mm) alcançado pela amostra após a sobreposição de cada placa. Os valores da espalhabilidade em função dos pesos adicionados foram determinados em triplicata, calculando-se a média. (BUGNOTTO e ET.AL., 2006). A determinação da consistência por extensibilidade oferece subsídios para discussão de espalhabilidade relacionada à caracterização reológica da amostra. (ISAAC, CEFALI, *et al.*, 2008).

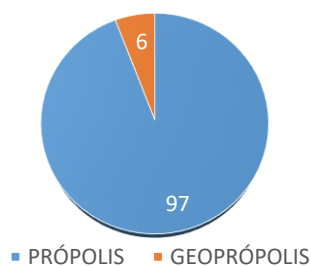
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Prospecção de patentes

Na literatura brasileira de patentes, não há registro de processo/produto similar ao aqui apresentado. No banco de dados do INPI a pesquisa mostrou que apenas (6) seis depósitos de patentes com termo “geoprópolis” foram registrados. Para o termo “própolis” foram encontrados (97) noventa e sete registros (gráfico 2).

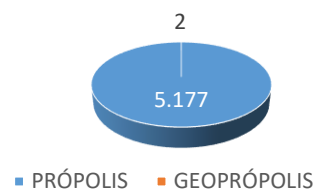
Ao buscar no Patentscope o termo “geoprópolis” em todas as linguagens e na página frontal dos documentos, se obteve um total de (2) dois depósitos de patentes em todo o mundo. Enquanto para o termo “própolis” foram registradas (5.177) cinco mil cento e setenta e sete depósitos (gráfico 3)

Gráfico 2: Número de depósitos de patentes com os termos "própolis" e "geoprópolis" / INPI



Fonte:(INPI) (1992-2020), disponível em gru.inpi.gov.br/pePI/servlet/PatenteServletControlle acesso em 08/05/2020.

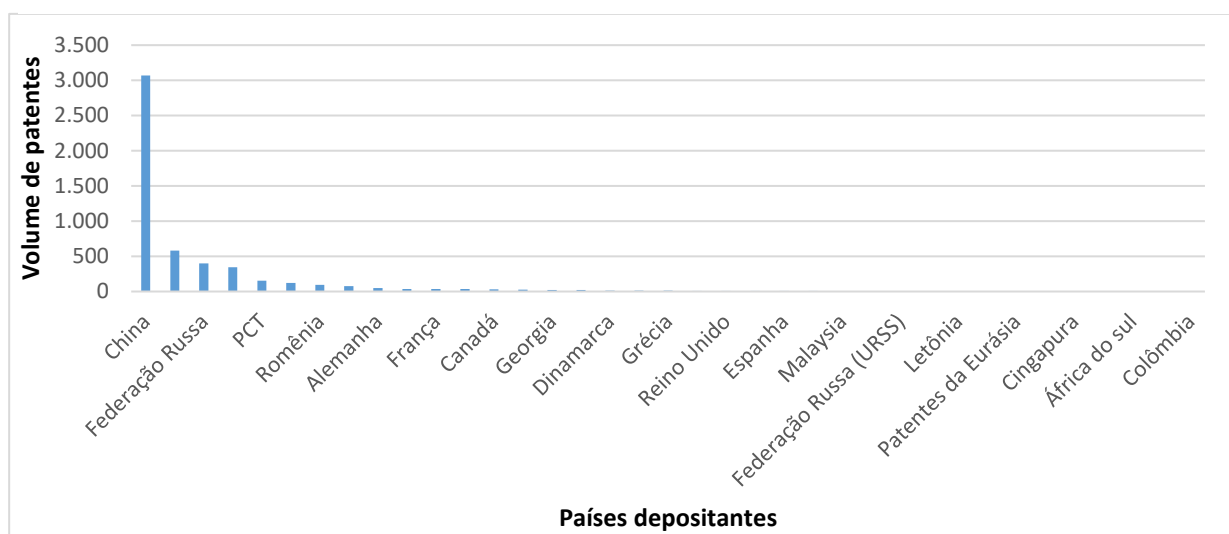
Gráfico 3: Depósitos de patente com os termos própolis e geoprópolis / PATENTSCOPE



Fonte: disponível em https://patentscope.wipo.int/search/pt/result.jsf?_vid=P22-K75IST-38228, acesso em 08/05/2020.

No gráfico 4, é possível observar o volume de patentes depositadas por cada país a respeito da “própolis”. Analisando a gráfico 4 é possível perceber que a China detém o maior número de depósitos de patentes (3.052) correspondendo a 58,95%, seguida da República da Korea (583) (11,26%), Rússia com (399) (7,70%), Japão (343) (6,62%) e os Estados Unidos da América (EUA) com (121) (2,33%). O Brasil se encontra na 22ª posição com apenas (9) registros de depósito de patentes internacionalmente o que corresponde a 0,17%.

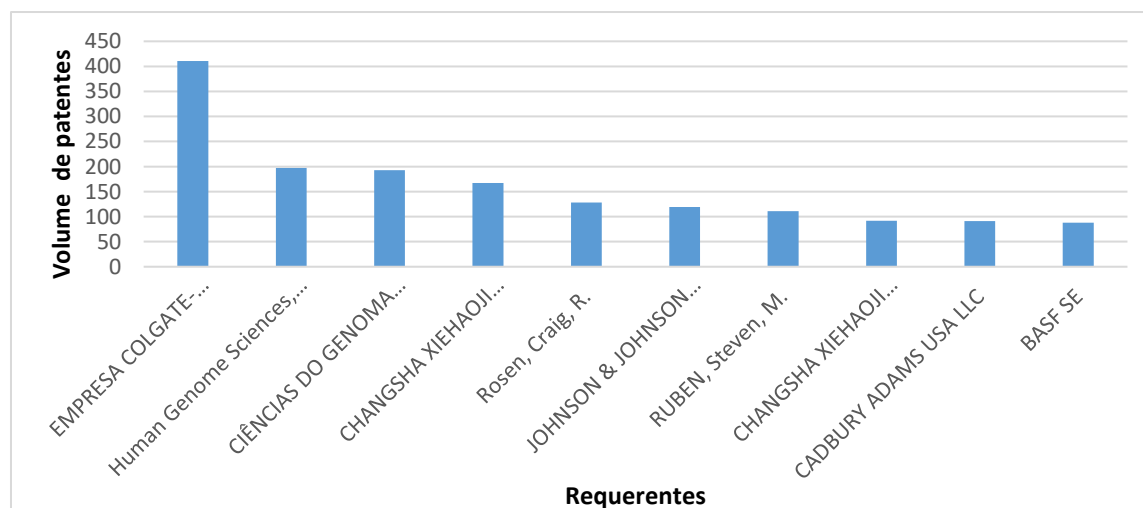
Gráfico 4: Volume de documentos de patentes relacionadas ao termo "própolis" por país depositante.



Fonte: Disponível em <https://patentscope.wipo.int/search/en/search.jsf> acesso em 08/05/2020.

Considerando os maiores depositantes de patentes relacionadas ao termo “própolis” observa-se que os maiores detentores de depósitos são empresas privadas seguidos de Instituições de Pesquisa Científica e Tecnológica (ICT), como é possível observar no (Gráfico 5).

Gráfico 5: Requerentes de documentos de patentes relacionadas ao termo "própolis" por país depositante.

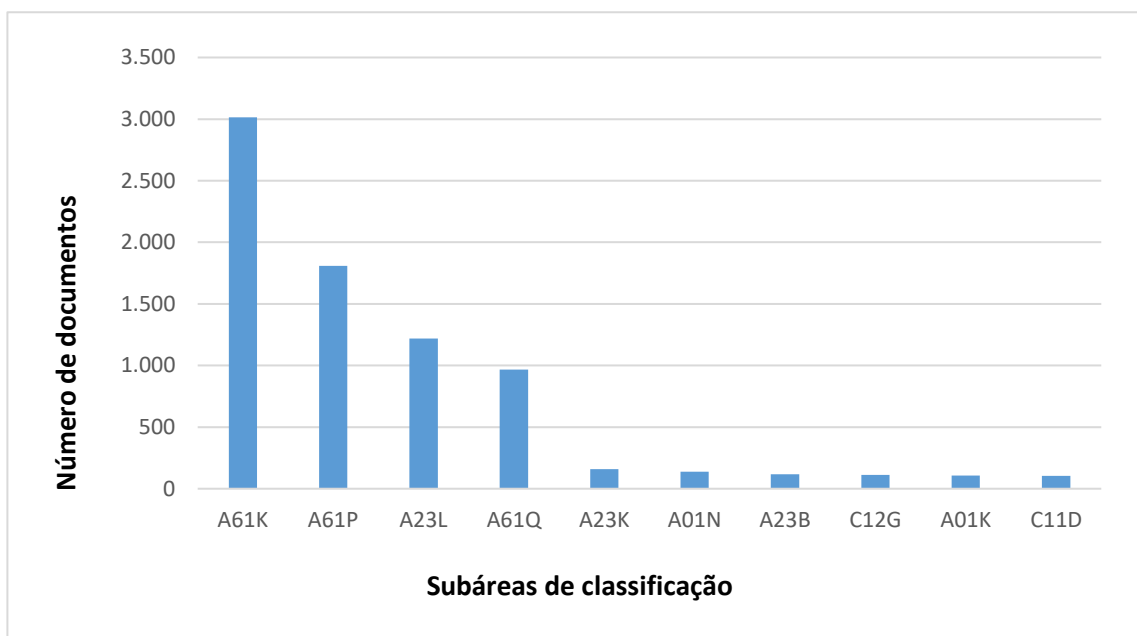


Fonte: Disponível em https://patentscope.wipo.int/search/en/result.jsf?_vid=P12-K9YEHV-84097 acesso em 08/05/2020.

A empresa Colgate Palmolive aparece como a maior detentora das patentes (411), responsável por 25,74% dos depósitos relacionado ao termo “própolis”, seguida de (ICTs), como a Human Genome Science Inc. (197) o que representa (12,34%) e a Ciências do Genoma Humano Inc. (193) com (12,09%).

O (gráfico 6) traz em ordem decrescente as subclassificações das áreas de acordo com a Classificação Internacional de Patentes (CIP) os volumes de documento de patentes depositados em cada uma.

Gráfico 6: Número de documentos de patentes relacionadas ao termo “própolis” pela CIP.



Fonte: Disponível em https://patentscope.wipo.int/search/en/result.jsf?_vid=P12-K9YGES-19090. acesso em 08/05/2020.

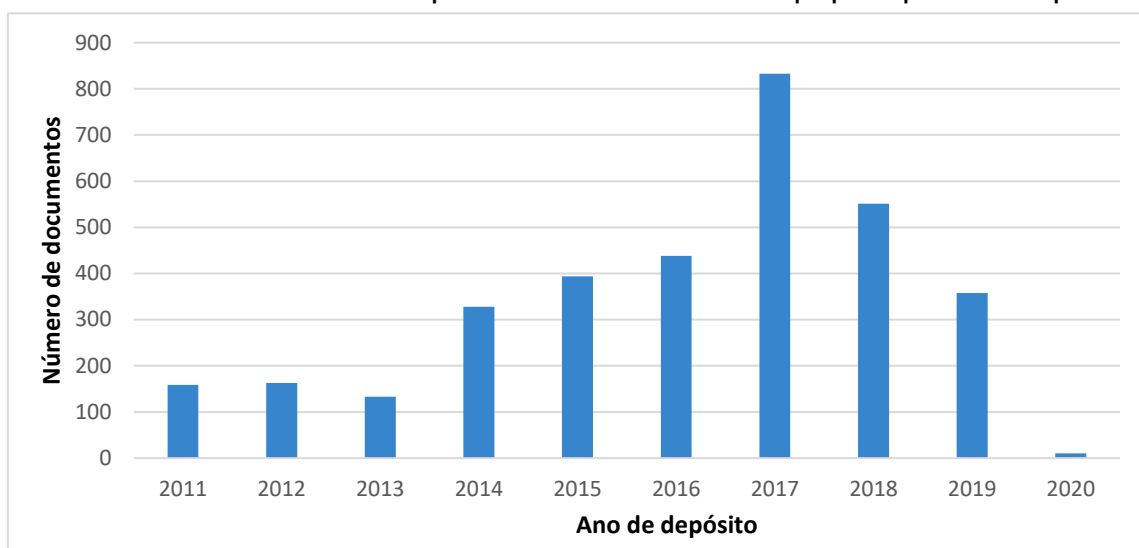
Analisando a área A, que se destacou no número de depósitos, os maiores números de depósitos foram nas subáreas A61K com (3.015) depósitos, que correspondem a preparações para fins médico e odontológicos; seguida da subárea A61P, (1.809) que correspondem a atividades terapêuticas específica de compostos químicos ou preparações medicinais e da subárea A23L, (1.219) que correspondem a alimentos, produtos alimentares ou bebidas não alcoólicas.

Diante dessas informações verifica-se que em análise individual a área odonto médica detém o maior número de depósitos de patentes.

Em decorrência da elevada utilização, usos diversificados e alto potencial de valor agregado da própolis, esse produto pode ser consumido e processado de diversas formas. O principal meio de utilização e processamento da própolis inclui a produção de extratos. E esse processamento dá origem a invenções em diversas áreas com formulações odonto-médicas, veterinárias, bebidas, nanotecnologia, manejo, embalagens e alimentos.

Devido a essa diversidade de opções de processamento e de consumo, o número de depósitos de patentes a respeito da própolis cresceu consideravelmente desde o ano de 2011, como é possível observar no (gráfico 7), com exceção apenas para o período de (2018-2020), em que houve uma diminuição no número de documentos de patentes depositadas.

Gráfico 7: Número de documentos de patentes relacionadas ao termo “própolis” por ano de depósito.



Fonte: Disponível em https://patentscope.wipo.int/search/en/result.jsf?_vid=P12-K9YGES-19090. acesso em 08/05/2020.

Na base de dados do Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI), a grande maioria das patentes pesquisadas (tabelas 8 e 9) envolvem formulações utilizando a própolis (processada pela abelha *Apis mellifera*), como a patente BR 10 2015 031753 0 (2015), que trata de uma “composição farmacêutica semissólida de extrato da própolis vermelha de Alagoas, combinada ao antimoniato de meglumina injetável e seu uso no tratamento da leishmaniose tegumentar”; a patente BR 10 2013 018492 6 (2013), propõe uma “formulação em gel, contendo própolis como preenchedor, antimicrobiano e desodorizante para uso no interior dos implantes dentários”.

Existe ainda a patente PI 0904121-4 (2009), referente a uma “formulação de um gel vaginal de própolis tipificada para o tratamento de doenças do sistema genital feminino”, e a patente PI 0105471-6 (2011), envolve “formulações a base de própolis para uso odontológico”.

Especificamente para a geoprópolis, as seguintes patentes foram consultadas: BR 10 2018 008156 0 (2018) que descreve uma “formulação cosmética anti candida contendo extrato de geoprópolis”. A patente BR 10 2016 002463 3 (2016) refere-se a uma formulação farmacêutica anti-helmíntica com o extrato seco da geoprópolis da abelha *Melipona fasciculata* Smith.

A patente PI 1102701-0 (2011), que trata de um “processo de obtenção do extrato hidroalcoólico de geoprópolis de *Melipona fasciculata* smith (tiúba) para preparação de formulações farmacêuticas de ação analgésica, anti-inflamatória e cicatrizante”, para uso via oral. PI 0905583-5 (2009), que descreve uma “formulação e composição farmacêutica e odontológica a base da geoprópolis e uso dessas composições”.

Os dados apresentados pelo INPI foram classificados de acordo com sua aplicação: Farmacológica (72), Bebidas (7), Odontológica (8), Manejo (6), Nanotecnologia (3), e Veterinária (1). Estes dados mostram os números de patentes em cada área assim consideradas para a própolis. Verificamos que a área farmacêutica assume destaque nas pesquisas com a própolis seguida das áreas de bebidas, odontológica e manejo.

As áreas Farmacêutica, Odontológica e Veterinária apresentam os depósitos de patentes mais recentes (2016-2018). Para a pesquisa com o termo “geoprópolis” apenas uma (1) pesquisa estava relacionada a área odontológica as demais encontram-se aplicadas a área farmacêutica (tabelas 9 e 10).

Estes apontamentos mostram como é ínfima a quantidade de estudos e pesquisas relacionados aos produtos das abelhas sem ferrão brasileiras, principalmente à "geoprópolis" que já se mostrou eficaz em diversas testes de atividades biológicas. Relevante cenário se apresenta como um campo fértil para novas depósitos de patentes relacionadas aos produtos destas abelhas.

Tabela 9: Patentes com o termo "geopropolis"

Quantidade	Pedido	Depósito	INPI - Patentes com o termo "geopropolis"	Aplicação
1	BR 10 2018 008156 0	23/04/2018	FORMULAÇÃO COSMÉTICA ANTI CANDIDA CONTENDO EXTRATO DE GEOPROPOLIS	FARMACÊUTICA
2	BR 10 2016 010613 3	11/05/2016	COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS PARA DISTÚRBIOS GÁSTRICOS A BASE DE GEOPRÓPOLIS	FARMACÊUTICA
3	BR 10 2016 002463 3	04/02/2016	FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA ANTI-HELMÍNTICA COM O EXTRATO SECO DA GEOPRÓPOLIS	FARMACÊUTICA
4	PI 1103291-0	05/07/2011	PROCESSO DE OBTENÇÃO, FORMULAÇÃO DE EXTRATOS PADRONIZADOS, FRAÇÃO E SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DA GEOPRÓPOLIS BRASILEIRA DE ABELHA SEM FERRÃO E SEU USO COMO AGENTE LEISHMANICIDA	FARMACÊUTICA
5	PI 1102701-0	15/06/2011	PROCESSO DE OBTENÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE GEOPRÓPOLIS DE MELIPONA FASCICULATA SMITH (TIÚBA) PARA PREPARAÇÃO DE FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS DE AÇÃO ANALGÉSICA, ANTIINFLAMATÓRIA E CICATRIZANTE	FARMACÊUTICA
6	PI 0905583-5	22/12/2009	COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS E ODONTOLÓGICAS A BASE DE GEOPRÓPOLIS E USO DESSAS COMPOSIÇÕES	FARMACÊUTICA/ODONTOLÓGICA

Fonte: INPI, disponível em <https://gru.inpi.gov.br/pePI/servlet/PatenteServletController>, acesso em :27/02/2020.

Tabela 10: INPI - Patentes com o termo "própolis"

Quantidade	Pedido	Depósito/ano	INPI - Patentes com o termo "própolis"	APLICAÇÃO
1	BR 20 2018 011344 0	05/06/2018	RESINA ORTODÔNTICA INCREMENTADA COM PRÓPOLIS AMARELA	ODONTOLÓGICA
2	BR 10 2018 009198 0	07/05/2018	CURATIVO CONTENDO PRÓPOLIS VERMELHA, PROCESSO DE OBTENÇÃO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, APLICAÇÃO NA PREVENÇÃO E TRATAMENTO DE FERIDAS	FARMACÊUTICA
3	BR 10 2018 003663 7	26/02/2018	SOLUÇÃO COLUTÓRIA CONTENDO PRÓPOLIS VERMELHA PARA COMBATE DE INFECÇÕES DA CAVIDADE BUCAL	ODONTOLÓGICA
4	BR 10 2017 023483 5	31/10/2017	FORMULAÇÃO À BASE DE PRÓPOLIS PARA O TRATAMENTO DE MASTITE BOVINA	VETERINÁRIA
5	BR 10 2017 021229 7	03/10/2017	DESENVOLVIMENTO DE GEL INCORPORADOS COM PRÓPOLIS VERMELHA BRASILEIRA PARA CONTROLE DE MICRORGANISMOS DÉRMICOS FACIAIS	FARMACÊUTICA

6	BR 10 2017 019367 5	11/09/2017	PROCESSO DE OBTENÇÃO E USO DO EXTRATO, FRAÇÕES E ÓLEO ESSENCIAL DE PRÓPOLIS DE SCAPTOTRIGONA BIPUNCTATA	FARMACÊUTICA
7	BR 10 2017 015070 4	13/07/2017	COMPOSIÇÃO A BASE DE PRÓPOLIS E ARNICA EM FORMA DE GEL	FARMACÊUTICA
58	BR 10 2017 011097 4	25/05/2017	DESENVOLVIMENTO DE DENTIFRÍCIOS INCORPORADOS COM PRÓPOLIS VERMELHA BRASILEIRA ASSOCIADOS A ARGININA, FLÚOR E HIDROXIAPATITA PARA CONTROLE DE MICROORGANISMOS ORAIS	ODONTOLÓGICA
9	BR 10 2017 002133 5	01/02/2017	USO DO MICROENCAPSULADO DE PRÓPOLIS VERMELHA COMO BIOPRODUTO COM AÇÃO ANTI-HIPERTENSIVA, HIPOTENSORA, ANTI-HIPERTRÓFICO, VASORRELAXANTE E ANTIOXIDANTE	FARMACÊUTICA
10	BR 10 2017 000088 5	03/01/2017	CASEINATOS DE PRÓPOLIS VERMELHA, PROCESSO DE OBTENÇÃO DE CASEINATOS, COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO OS MESMOS E USOS	FARMACÊUTICA
11	BR 10 2016 030857 7	28/12/2016	PROCESSO DE OBTENÇÃO DE MEMBRANAS BIOPOLIMÉRICAS MUCOADESIVAS COM INCORPORAÇÃO DE EXTRATO DE PRÓPOLIS VERMELHA E PRODUTO OBTIDO	FARMACÊUTICA
12	BR 10 2016 022940 5	03/10/2016	QUITOSINATOS DE PRÓPOLIS VERMELHA, PROCESSO DE OBTENÇÃO DE QUITOSINATOS, COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO OS MESMOS E USOS	FARMACÊUTICA
13	BR 10 2016 018951 9	17/08/2016	COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS REUMÁTICAS, UTILIZANDO OPOTERÁPICOS, DE COMPOSIÇÃO VARIADA, CONHECIDO COMO PRÓPOLIS, COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO OS MESMOS E SEUS USOS	FARMACÊUTICA
14	BR 10 2016 019014 2	17/08/2016	DESENVOLVIMENTO DE VERNIZ DENTÁRIO DE PRÓPOLIS VERMELHA PARA CONTROLE DE CÁRIE DENTÁRIA	FARMACÊUTICA
15	BR 10 2016 018124 0	04/08/2016	NANOESEFERAS CARREGADAS EXTRATO DE PRÓPOLIS VERMELHA, PROCESSO DE OBTENÇÃO DE NANOESEFERAS, COMPOSIÇÕES DERMOCOSMÉTICAS CONTENDO AS MESMAS E USOS	NANOTECNOLOGIA
16	BR 10 2016 016971 2	21/07/2016	FORMULAÇÃO ADJUVANTE CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE PRÓPOLIS VERMELHA BRASILEIRA E USO NA COMPOSIÇÃO DE VACINAS	FARMACÊUTICA
17	BR 10 2016 016995 0	21/07/2016	FORMULAÇÃO ANTIPARASITÁRIA A PARTIR DE ÓLEO ESSENCIAL DE PRÓPOLIS VERMELHA BRASILEIRA	FARMACÊUTICA
18	BR 10 2016 016742 6	20/07/2016	ADJUVANTE DE PRÓPOLIS VERMELHA BRASILEIRA E SEU USO EM UMA VACINA RECOMBINANTE DE SUBUNIDADE	FARMACÊUTICA
19	BR 10 2016 015826 5	07/07/2016	SOLUÇÃO UMECTANTE ORAL À BASE DE DERIVADOS DE CELULOSE E PRÓPOLIS E SEU PROCESSO DE OBTENÇÃO	FARMACÊUTICA

20	BR 10 2016 012345 3	31/05/2016	COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS REUMÁTICAS, UTILIZANDO OPOTERÁPICOS, DE COMPOSIÇÃO VARIADA, CONHECIDO COMO PRÓPOLIS, COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO OS MESMOS E SEUS USOS	FARMACÊUTICA
21	BR 10 2016 004295 0	25/02/2016	COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA DE MEDICAMENTO À BASE DE PRÓPOLIS	FARMACÊUTICA
22	BR 10 2016 003214 8	16/02/2016	EXTRATO DE PRÓPOLIS PARA USO NASAL	FARMACÊUTICA
23	BR 10 2015 033018 9	30/12/2015	PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE 7- HIDROXI- 4'METOXIISOFLAVONA (FORMONONETINA) A PARTIR DO FRACIONAMENTO DE PRÓPOLIS VERMELHA PELA EXTRAÇÃO COM LÍQUIDOS PRESSURIZADOS	FARMACÊUTICA
24	BR 10 2015 033031 6	30/12/2015	PROCESSO DE OBTENÇÃO E COMPOSIÇÃO DE NANOENCAPSULADOS DE EXTRATO DE PRÓPOLIS VERMELHA	NANOTECNOLOGIA
25	BR 10 2015 033039 1	30/12/2015	PROCESSO DE OBTENÇÃO DE MICROPARTÍCULAS MATRICIAIS DE PRÓPOLIS (EXTRATO SECO), MICROPARTÍCULAS MATRICIAIS DE PRÓPOLIS (EXTRATO SECO) OBTIDAS, FORMULAÇÕES COMPREENDENDO AS MESMAS E SEUS USOS	FARMACÊUTICA
26	BR 10 2015 031753 0	17/12/2015	COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA SEMISSÓLIDA DE EXTRATO DE PRÓPOLIS VERMELHA DE ALAGOAS (PVA) COMBINADA AO ANTIMONIATO DE MEGLUMINA INJETÁVEL E SEU USO NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR	FARMACÊUTICA
27	BR 11 2018 010432 9	23/11/2015	MÉTODO PARA A PREPARAÇÃO DE UM SISTEMA DE DISPERSÃO COLOIDAL DE PRÓPOLIS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA ESTÁVEL PARA VÁRIOS USOS	FARMACÊUTICA
28	BR 10 2015 024182 8	21/09/2015	COMPÓSITO MICROPARTICULADO DE PRÓPOLIS VERMELHA DE ALAGOAS COM QUITOSANA E SEU USO	FARMACÊUTICA
29	BR 10 2015 017528 0	22/07/2015	MÉTODO DE UTILIZAÇÃO E COMPOSIÇÃO À BASE DE EXTRATO HIDROALCÓOLICO DE PRÓPOLIS VERMELHA, A BASE DE ISOFLAVONAS, ÁCIDOS ORGÂNICOS COM EFEITO QUIMIOPREVENTIVO E QUIMIOTERÁPICO EM NEOPLASIAS MALIGNAS	FARMACÊUTICA
30	BR 10 2015 016405 0	08/07/2015	NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO EXTRATO DE PRÓPOLIS VERMELHA, PROCESSO DE OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS, COMPOSIÇÕES DERMOCOSMÉTICAS CONTENDO AS MESMAS, PROCESSO DE OBTENÇÃO DE COMPOSIÇÕES E USOS	NANOTECNOLOGIA
31	BR 10 2015 013241 7	08/06/2015	FORMULAÇÃO FOTOPROTETORA A BASE DE PRÓPOLIS VERMELHA	FARMACÊUTICA
32	BR 10 2014 032012 1	19/12/2014	PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE ÁCIDO 3,5-DIPRENYL-4-HIDROXICINÂMICO (ARTEPELIN C) EM EXTRATO DE PRÓPOLIS VERDE UTILIZANDO DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO E CO-SOLVENTE	FARMACÊUTICA
33	BR 10 2014 030238 7	03/12/2014	EXTRATO ALCOÓLICO DE PRÓPOLIS DO PANTANAL COM USO MEDICINAL	FARMACÊUTICA

34	BR 10 2014 025178 2	09/10/2014	ADESIVOS À BASE DE ACRILATOS INCORPORADOS COM EXTRATO DE PRÓPOLIS	FARMACÊUTICA
35	BR 10 2014 007319 1	12/03/2014	MICROENCAPSULADOS DE LIBERAÇÃO MODIFICADA DE PRÓPOLIS VERMELHA, PROCESSO DE OBTENÇÃO DE MICROENCAPSULADOS, COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO OS MESMOS, PROCESSO DE OBTENÇÃO DE COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICOS E USOS	FARMACÊUTICA
36	BR 10 2014 002303 8	10/01/2014	SOLUÇÃO TÓPICA GEL DE ALOE-VERA EXTRATO ALCOÓLICO DE PRÓPOLIS	FARMACÊUTICA
37	BR 10 2013 018492 6	19/07/2013	GEL DE PRÓPOLIS COMO PREENCHEDOR, ANTIMICROBIANO E DESODORIZANTE PARA USO NO INTERIOR DOS IMPLANTES DENTÁRIOS	ODONTOLÓGICA
38	BR 10 2013 010639 9	30/04/2013	COMPOSIÇÕES CONTENDO ATIVOS DE EXTRATO SECO DE PRÓPOLIS E PROCESSO DE PREPARAÇÃO DAS MESMAS	FARMACÊUTICA
39	BR 10 2013 005723 1	11/03/2013	PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE EXTRATO DE PRÓPOLIS E FORMULAÇÃO DE XAROPE PARA BEBIDA ENERGÉTICA A BASE DE MEL, PRÓPOLIS, GUARANÁ E SUCO NATURAL DE UVA	BEBIDAS
40	BR 10 2013 005725 8	11/03/2013	PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE EXTRATO DE PRÓPOLIS E FORMULAÇÃO DE XAROPE PARA BEBIDA ENERGÉTICA A BASE DE MEL, PRÓPOLIS, GUARANÁ E SUCO NATURAL DE ACEROLA	BEBIDAS
41	BR 10 2013 005729 0	11/03/2013	PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE EXTRATO DE PRÓPOLIS E FORMULAÇÃO DE XAROPE PARA BEBIDA ENERGÉTICA A BASE DE MEL, PRÓPOLIS, GUARANÁ, E SUCO NATURAL DE CACAU	BEBIDAS
42	BR 10 2013 005726 6	11/03/2013	PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE EXTRATO DE PRÓPOLIS E FORMULAÇÃO DE XAROPE PARA BEBIDA ENERGÉTICA A BASE DE MEL, PRÓPOLIS, GUARANÁ E SUCO NATURAL DE AÇAÍ	BEBIDAS
43	BR 10 2013 005727 4	11/03/2013	PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE EXTRATO DE PRÓPOLIS E FORMULAÇÃO DE XAROPE PARA BEBIDA ENERGÉTICA A BASE DE MEL, PRÓPOLIS, GUARANÁ E SUCO NATURAL DE JABUTICABA	BEBIDAS
44	BR 11 2014 005413 4	07/09/2012	COMPOSIÇÕES ANTI-INFLAMATÓRIAS QUE COMPREENDEM MALDIVINA-3-O-BETA-GLUCOSÍDEO E UM EXTRATO DE PRÓPOLIS	FARMACÊUTICA
45	BR 10 2012 019950 5	09/08/2012	FORMULAÇÕES COSMÉTICAS E FARMACÊUTICAS A BASE DE ÓLEO DE CAFÉ E PRÓPOLIS	FARMACÊUTICA
46	BR 10 2012 013590 6	24/05/2012	MICROENCAPSULADOS DE PRÓPOLIS VERMELHA, PROCESSO DE OBTENÇÃO DE MICROENCAPSULADOS, COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO OS MESMOS, PROCESSO DE OBTENÇÃO DE COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS E USOS	FARMACÊUTICA
47	BR 10 2012 010441 5	03/05/2012	FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA DE PRÓPOLIS VERDE PARA USO HUMANO EM ODONTOLOGIA	ODONTOLÓGICA
48	PI 1106411-0	28/09/2011	PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE EXTRATO DE PRÓPOLIS E FORMULAÇÃO DE XAROPE PARA BEBIDA ENERGÉTICA A BASE DE MEL E	BEBIDAS

PRÓPOLIS				
49	MU 9100461-6	15/03/2011	DISPOSIÇÃO INTRODUZIDA EM COLETOR DE PRÓPOLIS	MANEJO
50	PI 1100760-5	07/01/2011	BIOCURATIVO DE LIBERAÇÃO SUSTENTADA OBTIDO A PARTIR DE BIOCELULOSE E EXTRATO DE PRÓPOLIS, BEM COMO SEU PROCESSO DE OBTENÇÃO E APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS	FARMACÊUTICA
51	PI 1005619-0	13/12/2010	VERNIZ POLIMÉRICO DE PRÓPOLIS	MANEJO
52	PI 1004808-1	27/10/2010	COMPOSIÇÕES BASEADAS EM NANOPARTÍCULAS DE PRÓPOLIS, PROCESSOS DE OBTENÇÃO E USO	FARMACÊUTICA
53	PI 1000614-1	29/01/2010	PROCESSO PARA FRACIONAMENTO DE PRÓPOLIS EM PÓ SECO E PASTA COMPOSTA DE CERAS E PRODUTOS RESULTANTES	FARMACÊUTICA
54	PI 1000615-0	29/01/2010	PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE EXTRATO OLEOSO DE PRÓPOLIS COM ALTO RENDIMENTO E PRODUTOS RESULTANTES	FARMACÊUTICA
55	PI 0904121-4	01/10/2009	GEL VAGINAL DE PRÓPOLIS TIPIFICADA PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS DO SISTEMA GENITAL FEMININO	FARMACÊUTICA
56	PI 0903713-6	30/07/2009	XAROPE DE RIFAMPICINA, PRÓPOLIS E MEL PARA TRATAMENTO DA TUBERCULOSE	FARMACÊUTICA
57	PI 0903699-7	30/07/2009	PRÓPOLIS VERMELHA E MELITO PARA TRATAMENTO DA MASTITE BOVINA	FARMACÊUTICA
58	PI 0903866-3	03/04/2009	PROCESSO DE CONCENTRAÇÃO DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS POR NANOFILTRAÇÃO E PRODUTO OBTIDO POR TAL PROCESSO	FARMACÊUTICA
59	PI 0806114-9	12/11/2008	GEL TERMORREVERSÍVEL DE LIBERAÇÃO SUSTENTADA CONTENDO EXTRATO PADRONIZADO DE PRÓPOLIS (EPP -AF) E RESPECTIVO PROCESSO DE FABRICAÇÃO, COM ATIVIDADE ANTI- SÉPTICA E CICATRIZANTE PARA TRATAMENTO DE QUEIMADURAS, LESÕES DE PELE E OUTROS	FARMACÊUTICA
60	MU 8802399-0	21/10/2008	DISPOSIÇÃO CONSTRUTIVA APLICADA EM ABSORVENTE FEMININO E FRALDA GERIÁTRICA COM PROTEÇÃO À BASE DE PRÓPOLIS	FARMACÊUTICA
61	PI 0803475-3	17/09/2008	EXTRATOS DE PRÓPOLIS VERMELHA, FRAÇÕES ATIVAS DOS EXTRATOS, COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS E SEU USO	FARMACÊUTICA
62	PI 0802099-0	03/06/2008	MÉTODO DE PRODUÇÃO DE GEL DENTAL CONTENDO PRÓPOLIS E GEL DENTAL CONTENDO PRÓPOLIS	ODONTOLÓGICA
63	PI 0800363-7	10/03/2008	PROCESSO DE OBTENÇÃO DE EXTRATOS PADRONIZADOS, FRAÇÕES E SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE PRÓPOLIS OU ESPÉCIES DE BACCHARIS, FORMULAÇÕES DE EXTRATOS PADRONIZADOS, FRAÇÕES E SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE PRÓPOLIS OU ESPÉCIES DE BACCHARIS, E O USO DE FORMULAÇÕES DE EXTRATOS PADRONIZADOS, FRAÇÕES E SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE PRÓPOLIS OU ESPÉCIES DE BACCHARIS COMO SANITIZANTES, ANTI-SÉPTICOS E/OU DESINFETANTES	FARMACÊUTICA

64	PI 0703369-9	14/08/2007	ÁGUA AROMATIZADA COM PRÓPOLIS	BEBIDAS
65	PI 0703118-1	20/07/2007	DISPOSITIVO PARA COLETA DE PRÓPOLIS	MANEJO
66	PI 0702990-0	18/07/2007	PROCESSO DE FABRICAÇÃO DO EXTRATO DE PRÓPOLIS EM SOLUÇÃO AQUOSA E PRÓPOLIS EM SOLUÇÃO AQUOSA	FARMACÊUTICA
67	PI 0705948-5	27/03/2007	POMADA DE PRÓPOLIS PARA FERIDAS INFECTADAS E ÚLCERAS DE DECÚBITO	FARMACÊUTICA
68	PI 0605768-3	21/12/2006	PROCESSO DE OBTENÇÃO DOS NÚCLEOS-LLOSA2 E LLOSC3 (À BASE DE PRÓPOLIS) NA NUTRIÇÃO E MEDICAMENTOS PARA RUMINANTES	FARMACÊUTICA
69	PI 0618529-0	10/11/2006	MEIO ANTIVIRAL, ABRANGENDO ZEÓLITOS ATIVADOS EM FORMA TRIBOMECÂNICA, PRÓPOLIS E COLOSTRO	FARMACÊUTICA
70	C1 0506393-0	16/08/2006	A BASE DE PRÓPOLIS, NA OBTENÇÃO DO NÚCLEO/ADITIVO-SL49C3 UTILIZADO EM DIETAS E MEDICAMENTOS PARA MONOGÁSTRICOS	FARMACÊUTICA
71	PI 0601863-7	27/01/2006	COMPOSIÇÕES MEDICAMENTOSAS A BASE DE PRÓPOLIS BRASILEIRA TIPIFICADA COM ATIVIDADE LESHMANICIDA E MÉTODO DE TRATAMENTO	FARMACÊUTICA
72	PI 0506243-8	06/09/2005	PROCESSO DE OBTENÇÃO DE EXTRATO DE PRÓPOLIS PARA USO ODONTOLÓGICO E FORMULAÇÕES DE PRÓPOLIS PARA USO ODONTOLÓGICO	ODONTOLÓGICA
73	PI 0506393-0	06/09/2005	PROCESSO DE OBTENÇÃO DE NÚCLEOS UTILIZADOS EM DIETAS E DE MEDICAMENTOS PARA COELHOS A BASE DE PRÓPOLIS	FARMACÊUTICA
74	PI 0501875-7	16/05/2005	OBTENÇÃO DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS SOB DIFERENTES CONDIÇÕES E AVALIAÇÃO DE SUA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA	FARMACÊUTICA
75	PI 0502448-0	18/04/2005	PRODUTOS APÍCOLAS (EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS E MEL) E SEUS USOS COMO FUNGICIDA NO CONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS E NUTRIENTE FOLIAR PARA PLANTAS E FONTE DE CARBOIDRATOS	FARMACÊUTICA
76	PI 0500175-7	18/01/2005	PROCESSO DE OBTENÇÃO DE COMPONENTES ATIVOS DE PRÓPOLIS NO ESTADO SÓLIDO	FARMACÊUTICA
77	PI 0405483-0	02/12/2004	PROCESSO DE OBTENÇÃO DO EXTRATO PADRONIZADO DE PRÓPOLIS, EXTRATO ASSIM OBTIDO, SUAS FORMULAÇÕES, PRODUTOS E USOS	FARMACÊUTICA
78	PI 0406492-5	07/07/2004	SPRAY COMPOSTO DE PRÓPOLIS DIET	FARMACÊUTICA
79	PI 0402942-9	07/07/2004	PRÓPOLIS SPRAY DIET	FARMACÊUTICA
80	PI 0400975-4	29/03/2004	PRÓPOLIS EFERVESCENTE	FARMACÊUTICA
81	PI 0306421-2	16/12/2003	PROCESSO DE IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES VEGETAIS CONSTITUINTES DA PRÓPOLIS	FARMACÊUTICA
82	MU 8303286-0	29/08/2003	COLETOR DE PRÓPOLIS PAS	MANEJO
83	PI 0202728-3	01/07/2002	PROCESSO DE OBTENÇÃO DE PRÓPOLIS EM SOLUÇÃO DE ÓLEO VEGETAL E PRODUTO RESULTANTE	FARMACÊUTICA

84	PI 0200303-1	25/01/2002	PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE COMPRIMIDOS À BASE DE PRÓPOLIS E AGÁRICOS	FARMACÊUTICA
85	PI 0106798-2	13/12/2001	PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE ÓLEO DE OVO COM ATIVIDADE NUTRICIONAL, PROCESSO DE OBTENÇÃO DE EXTRATO FLUIDO DE PRÓPOLIS, COMPOSIÇÃO SINÉRGICA NUTRICIONAL A BASE DO REFERIDO ÓLEO DE OVO E DO REFERIDO EXTRATO FLUIDO DE PRÓPOLIS E PROCESSO DE OBTENÇÃO DE CÁPSULAS NUTRICIONAIS CONTENDO INGREDIENTES ATIVOS NUTRICIONAIS A BASE DE ÓLEO DE OVO E PRÓPOLIS	FARMACÊUTICA
86	PI 0105471-6	26/09/2001	FORMULAÇÕES À BASE DE PRÓPOLIS PARA USO ODONTOLÓGICO	ODONTOLÓGICA
87	PI 0006272-3	22/12/2000	PROCESSO DE IDENTIFICAÇÃO DE TIPAGENS DA PRÓPOLIS BRASILEIRA	FARMACÊUTICA
88	PI 0002320-5	15/06/2000	PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE EXTRATO LÍQUIDO À BASE DE PRÓPOLIS	FARMACÊUTICA
89	PI 0002222-5	18/04/2000	INSETICIDA E REPELENTE À BASE DE PRÓPOLIS	FARMACÊUTICA
90	PI 9905034-0	30/09/1999	USINA PARA MACERAÇÃO DE PRÓPOLIS	FARMACÊUTICA
91	PI 9811152-3	04/08/1998	COMPOSIÇÃO QUE COMPREENDE PRÓPOLIS E PELO MENOS UM ÓLEO ESSENCIAL E UTILIZAÇÃO DA MESMA	FARMACÊUTICA
92	PI 9802182-6	22/06/1998	EFEITOS BIOLÓGICOS RESULTANTES DA INGESTÃO DE GLUCOSE LIVRE E DAMISTURA MEL/PRÓPOLIS.	FARMACÊUTICA
93	MU 7800804-2	15/04/1998	DISPOSITIVO COLETOR DE PRÓPOLIS, ACOPLADO A COLMEIA DE ABELHAS	MANEJO
94	PI 9802777-8	10/02/1998	PROCESSO PARA A OBTENÇÃO DE PRÓPOLIS EM SOLUÇÃO AQUOSA.	FARMACÊUTICA
95	PI 9705316-3	23/10/1997	PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE PRÓPOLIS	FARMACÊUTICA
96	MU 7501840-3	02/08/1995	CAIXA COLETORA DE PRÓPOLIS	MANEJO
97	PI 9203327-0	26/08/1992	EXTRATO DE PRÓPOLIS PURIFICADO, PROCESSO PARA PREPARAÇÃO DO MESMO E COMPOSIÇÃO	FARMACÊUTICA

Fonte: Pesquisa a partir de dados INPI, disponível em <https://gru.inpi.gov.br/pePI/servlet/PatenteServletController>, acesso em 27/02/2020.

4.2 Análise microbiológica

Para as análises realizadas pela Técnica de Número Mais Provável (NMP), a combinação de tubos positivos e negativos permitiu estimar, através da probabilidade, a densidade de microorganismos nas amostras, calculados e determinados na Tabela de Hoskins de NMP. Esta tabela forneceu um intervalo de confiança de 95% de probabilidade, para diversas combinações de tubos positivos em série de três tubos.

Para a confirmação de *Escherichia coli* procedeu-se as análises de acordo com o método de referência, tendo os resultados expressos considerando a Técnica de Número Mais Provável (NMP), utilizada nas etapas anteriores.

Com relação aos coliformes a 45°C, observou-se que 03 (30%) amostras apresentaram crescimento, com $2,1 \times 10^3$, $4,6 \times 10^2$ e $>1,1 \times 10^3$ NMP/g. Para o último caso, além dos coliformes a 45°C, foi confirmada a presença da *Escherichia coli*, com concentração de 4,0 NMP/g. Estes resultados corroboram com os apresentados por LIMA (2015) que observou que amostras da geoprópolis da abelha *Melipona scutellaris* exibiram contagens para coliformes totais variando de ($9,1 \times 10^7$ a $4,4 \times 10^8$) e *E. coli* ($8,1 \times 10^7$ a $3,6 \times 10^8$).

Um estudo realizado com geoprópolis de *Tetragonisca angustula*, geoprópolis de *M. scutellaris*, *Melipona quadrifasciata antiochioides* e *Melipona asilvai* produzidas em uma área restrita no Recôncavo da Bahia encontrou nas amostras da geoprópolis de *T. angustula* um percentual de 50% para contagem de coliformes totais, obtendo-se resultados entre 1100 NMP/g e nenhuma das amostras foi positiva para presença de coliformes termotolerantes. Ainda com amostras de geoprópolis de *M. scutellaris*, o mesmo estudo constatou um percentual de 40% para contagem quanto à presença de coliformes totais, obtendo-se valores entre 1100 NMP/g, bem como foram detectados em 100% das amostras da geoprópolis de *M. asilvai*, obtendo valores entre 23 e >1100 NMP/g (SOUZA e ET.AL., 2011).

As bactérias do gênero *E. coli* pertencem à família Enterobacteriaceae e são microrganismos anaeróbios facultativos, reduzem nitrato a nitrito, fermentam glicose e é oxidase-negativa. Metaboliza uma ampla variedade de substâncias

como carboidratos, proteínas, aminoácidos, lipídeos e ácidos orgânicos. Produz catalase e utiliza glicose como fonte de carbono (ANVISA, 2001).

O principal habitat de *E. coli* é o trato intestinal dos humanos e de outros animais de sangue quente. A maioria dos sorogrupos de *E. coli* faz parte da flora comensal do intestino dos mamíferos. No entanto, certos sorotipos são patogênicos para o homem e para outros animais e estes não são considerados como fazendo parte da flora intestinal normal. A transmissão das infecções causadas por *E. coli* seguem principalmente três vias: o contato direto com animais, o contato com humanos e o consumo de alimentos contaminados (CARNEIRO, 2008).

A presença de coliformes termotolerantes em alimentos não quer dizer necessariamente que exista contaminação de origem fecal. Contudo, a presença de coliformes totais e/ou termotolerantes em alimentos pode indicar falhas na higiene dos processos de coleta e contaminação pós-processo. Do mesmo modo, a ausência de coliformes não significa que um alimento esteja livre de patógenos. Assim, a detecção de coliformes totais e termotolerantes em alimentos ainda constitui um importante instrumento de orientação para os manipuladores de alimentos e para a aplicação de boas práticas de fabricação na produção de alimentos (CASTRO, 2018).

Podemos extrapolar para o monitoramento dos alimentos presentes nas colônias (mel, pólen), uma vez que organismos encontrados nas abelhas, nas colônias, no pólen, no solo e nas flores, por exemplo, também são encontrados no mel. Dentre esses microorganismos, estão *Bacillus*, *Clostridium*, *Sacharomyces* e *Lactobacillus* (SNOWDON e CLIVER, 1996). Segundo Franchin et al., (2013) elementos minerais e outras substâncias podem ser transferidos das abelhas para o mel através do contato durante o armazenamento na colônia. A contaminação antrópica dos produtos dentro das colônias pode existir através do manejo desse material de forma inadequada.

Quanto ao gênero *Salmonella*, todas as amostras aqui estudadas apresentaram ausência em 25 gramas do produto. As amostras da geoprópolis de *M. scutellaris* coletas na região da Baía do Iguape, Bahia, Brasil, de modo

semelhante, apresentaram ausência microbiológica para a *Salmonella sp* (LIMA, 2015) .

As bactérias do gênero *Salmonella* têm ampla distribuição mundial, são correntes nos ambientes de produção animal, constituindo-se também em potencial problema sanitário para a saúde pública. A transmissão de *Salmonella sp.* ao homem ocorre principalmente pela ingestão de produtos de origem animal contaminados, o que pode resultar em 45 toxinfecções alimentares, sendo considerada uma das mais importantes causas de doença de origem alimentar entre humanos (BOROWSKY, BESSA, et al., 2006).

Além desses, para contagem de *Bacillus cereus*, 06 amostras (60%), apresentaram o micro-organismo, com níveis de concentração que variaram de $1,0 \times 10^2$ a $9,6 \times 10^2$ UFC/g. Estes valores corroboram com outras pesquisas, como:

Um estudo da microbiota de produtos das abelhas (mel, pólen, geoprópolis) em colônias de melíponas mostrou que o produto mais contaminado foi a geoprópolis tanto em *M. scutellaris* (68,42%) como em *T. clavipes* (54,55%). A identificação dos microorganismos mostrou que as espécies predominantes foram *Bacillus cereus* (26,32%) e *Bacillus mycoides* (36,36%) respectivamente (SANTOS,2007).

Outro trabalho também pesquisou a flora microbiana em colônias de *M. scutellaris* e isolou *Bacillus*, com contagens de $5,3 \times 10^6$, $3,5 \times 10^4$, $1,1 \times 10^3$ e $6,0 \times 10^2$ UFC.g-1 em geoprópolis, mel, pólen e alimento larval respectivamente (RAMOS, 1998). Em amostras de méis provenientes da Argentina também foram identificadas espécies do *Bacillus cereus* (26%), (IURLINA e FRITZ, 2005).

O *Bacillus cereus* é uma bactéria aeróbia facultativa, formadora de esporos, comumente encontrada em solos, vegetais e em vários alimentos processados e crus. Este microorganismo é capaz de produzir toxinas, incluindo enterotoxinas, fosfolipases, proteases e hemolisinas. O consumo de alimentos que contenham uma concentração superior a 10^6 *B. cereus*/g pode resultar em intoxicação alimentar. Esta espécie está entre as predominantes em surtos de

intoxicação alimentar, causando diarreia e emese sendo estas alterações atribuídas à ação das enterotoxinas (AGATA, OHTA e YOKOYAMA, 2002).

Uma pesquisa sobre a biologia das abelhas sem ferrão indicou que a *Melipona quadrifasciata* não pode sobreviver sem uma espécie de *Bacillus* encontrada no ninho (MACHADO, 1971). Uma pesquisa demonstrou a importância do gênero *Bacillus* para a sobrevivência da colônia: durante um mês, uma colônia foi alimentada com xarope de açúcar misturado com estreptomicina, um antibiótico que matou espécies de *Bacillus in vitro*. Após o tratamento, as novas células de crias foram continuamente destruídas, e a colônia morreu após 30 dias (MENEZES, 2015)

Segundo Menezes (MENEZES, 2015), dois gêneros de bactérias foram identificados em colônias de abelhas sem ferrão os mais comuns presentes são do gênero *Bacillus*. Estes microorganismos foram encontrados no pólen armazenado, no provisionamento de crias, no trato digestivo de larvas e em abelhas adultas, e de forma menos abundante no mel.

O gênero *Bacillus* parece desempenhar um papel importante na secreção de enzimas que funcionam como agentes catalisadoras, numa série de reações bioquímicas que convertem os alimentos das abelhas em produtos mais digeríveis e estáveis, para serem guardados e utilizados (NOGUEIRA-NETO, 1997). As fermentações acéticas e lácticas, que ocorrem no pólen e no mel, também são realizadas por estas bactérias (MENEZES, 2015).

Além da função aparente na digestão dos alimentos, Yoshiyama e Kimura (2009) encontraram fortes evidências de que espécies do gênero *Bacillus* também secretam antibióticos. Ao utilizá-las em ensaios de inibição *in vitro*, os autores demonstraram que as cepas de *Bacillus* do trato digestivo da *Apis cerana japonica* (abelha-do-mel-japonesa) inibe a *Paenibacillus larvae*, que causa a *American foulbrood disease* (cria pútrida americana).

Considerando os resultados para a presença de clostrídios sulfito redutores a 46°C, nenhuma amostra da geoprópolis aqui pesquisada apresentou resultado positivo corroborando com pesquisa demonstrada por Lima (2015) que ao

investigar amostras da geoprópolis da *Melipona scutellaris* também não encontrou a presença destes microorganismos.

A contagem positiva de *Staphylococcus coagulase* não foi verificada neste estudo, diferente de (LIMA, 2015) que encontrou em amostras da geoprópolis de *M. scutellaris* contagem para *Staphylococcus coagulase* positiva variando de ($5,0 \times 10^7$ UFC/g - $9,6 \times 10^6$ UFC/g).

A investigação das bactérias aeróbias mesófilas na geoprópolis da *Melipona q. anthidioides* apresentou contagens variando de ($9,8 \times 10^2$ a $1,9 \times 10^3$ UFC/g). Esses valores são inferiores ao encontrados por Lima (2015) entre ($9,6 \times 10^9$ UFC/g – $1,0 \times 10^{10}$ UFC/g) na geoprópolis de *M. scutellaris*. Avaliando a qualidade microbiológica de amostras de própolis produzida em Portugal, Dias et al., (2012), encontrou resultados representados com média para microorganismos aeróbios mesófilos (71.666,70 UFC/g e 106.76 UFC/g).

A legislação brasileira, em sua Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2001) não estabelece parâmetros para a contagem padrão em placas de microorganismos heterotróficos aeróbios mesófilos. Embora os microorganismos mesófilos aeróbios não estejam diretamente ligados à presença de patógenos ou suas toxinas, estes são úteis na avaliação da inocuidade, indicando deficiências nas condições sanitárias ou nas etapas de processamento (SILVA, 2010 apud LIMA 2015).

Em se tratando de bolores e leveduras, todas as colônias em estudo apresentaram contagem superior ao preconizado pela *American Public Health Association* (APHA) para alimentos. A contagem destes microorganismos nas amostras da geoprópolis da *Melipona q. anthidioides* variaram de $2,0 \times 10$ UFC/g a $8,1 \times 10^2$ UFC/g.

Lima (2015) encontrou contagem para bolores e leveduras, em amostras da geoprópolis da *Melipona scutellaris* em dois meliponários diferentes com uma média de contagem de microorganismos de $1,1 \times 10^8$ UFC/g e $6,6 \times 10^7$ UFC/g.

Santos (2007) também observou o crescimento de fungos em geoprópolis proveniente de *M. scutellaris* e *T. clavipes*, além do crescimento de leveduras em geoprópolis de *M. scutellaris*.

De acordo com Barth (2003) em períodos de escassez, as abelhas podem forragear nos mais diversos substratos, desde colônias fúngicas passando por solo, argila e até mesmo matéria orgânica de origem fecal. Ferraz et al. (2008) relataram a ocorrência de vários fungos filamentosos isolados de abelhas operárias da *Melipona subnitida*.

Eltz (2002), ressalva que a coleta de fungos por abelhas em substituição ao pólen foi verificada em espécies dos gêneros *Apis*, *Trigona* e *Partamona*. Espécie de levedura foi isolada em abelhas sem ferrão, e associada aos alimentos (mel e pólen), própolis, detritos e abelhas adultas, das espécies *M. quadrifasciata*, *M. rufiventris*, *T. angustula* e *Trigona fulviventris* (TEIXEIRA e ET.AL., 2003).

Observações semelhantes foram também percebidas por Roubik (1989) e Oliveira e Morato (2000). Eles descobriram que as operárias de abelhas sem ferrão lambem ou colhem uma massa mucilagínosa de cogumelos véu-de-noiva (Fungi, Phallales).

De acordo com Menezes (2015), ainda não se sabe o que motiva este comportamento. O valor nutritivo dos esporos é baixo se comparados ao do pólen, mas podem complementar sua dieta se a disponibilidade for alta e a colheita for relativamente fácil.

Para Paludo (2019) a abelha sem ferrão brasileira *Scaptotrigona depilis* Moure, 1942 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) requer o fungo *Zygosaccharomyces* sp. para se desenvolver. Sua pesquisa mostrou que esse fungo, que começa a crescer dentro das células da ninhada após a eclosão dos ovos, é ingerido pelas larvas e é uma fonte essencial de ergosterol para a produção de ecdisteróides.

Estudos envolvendo a microbiota associada à abelha *Apis mellifera* demonstraram a importância destes microrganismos para a saúde das abelhas e a suscetibilidade a parasitas (ROSSO e ENGEL, 2018).

A importância das leveduras e os seus papéis potenciais para colônias de meliponíneos é semelhante às funções bacterianas; ou seja, elas secretam enzimas que convertem substâncias de alimentos armazenados e ajudam a preservá-los. A fermentação alcoólica também é um processo iniciado com a levedura (MENEZES, 2015)

Um papel interessante das leveduras foi descrito por Camargo et al., (1992). Leveduras do gênero *Candida* parecem desidratar o pólen armazenado pela abelha sem ferrão *Ptilotrigona lurida*. Este processo de desidratação é eficiente para evitar a deterioração e prevenir que os forídeos (*Phoridae*, *Pseudohyocera*) consumam pólen e causem sérios danos para a colônia dessa espécie de abelha

Em resumo, leveduras como seres ubíquos estão amplamente dispersas, podem ocorrer nos principais ambientes bióticos e abióticos, como solo, água, na atmosfera, em plantas, animais e insetos. Em certos momentos alguns destes habitats são apenas transitórios; ventos podem atuar na dispersão destes microrganismos, tal qual, o carreamento na superfície de um inseto, ou o decaimento de uma fruta ao solo. Além disto, a migração humana também contribui para a dispersão destes microrganismos, como ocorreu no caso das leveduras fermentadoras de bebidas alcoólicas (BARBOSA, PONTES, et al., 2018)

Segundo (LIMA, 2015), não existem estudos sobre a quantidade de microorganismos presente na geoprópolis da *M. scutellaris*, mas segundo essa alta incidência pode ser explicada, considerando que as abelhas sociais sem ferrão (*M. scutellaris*) coletam solo para produzir a geoprópolis, que é comum nas colmeias da espécie estudada. Ainda segundo este autor outros trabalhos relacionados à quantificação de microrganismos na própolis foram desenvolvidos, porém foram trabalhos analisando própolis produzida por *A. mellifera*, sendo ainda poucos trabalhos com geoprópolis de abelhas sociais sem ferrão.

Até o momento, poucos trabalhos abordaram, de alguma perspectiva, a microbiota intestinal de abelhas sem ferrão da *Melipona quadrifasciata*, (VÁSQUEZ e ET.AL., 2012). Um estudo pioneiro apresentou uma abordagem

comparativa da microbiota intestinal de abelhas corbiculadas de diferentes continentes (KWONG e ET.AL., 2017).

A microbiota intestinal das abelhas pode também exercer funções extracorpóreas, uma vez que a produção dos alimentos na colônia ocorre a partir da inoculação de secreções e microrganismos do trato digestório das abelhas nos recursos coletados (néctar, pólen e própolis) (LEE, 2014).

A elucidação da diversidade de microrganismos que vivem em simbiose com abelhas sem ferrão é importante para o melhor entendimento das relações ecológicas que mantêm o equilíbrio das populações nativas e de seus processos vitais na colônia. Igualmente, essa diversidade de microrganismos também atrai atenção do ponto de vista biotecnológico, para a prospecção de produtos bioativos de interesse médico e industrial. Nas últimas décadas, a elucidação de simbioses microbianas na natureza culminou no reconhecimento crescente de que produtos naturais isolados de plantas e animais são na maioria das vezes produtos metabólicos derivados de seus microrganismos coexistentes (CHALLINOR e BODE, 2015).

Existem muitas lacunas no conhecimento acerca dos papéis desempenhados pelos microrganismos associados à maturação dos produtos das abelhas dentro dos ninhos destas. Mas, no contexto de abelhas sem ferrão, há primariamente uma defasagem de dados relacionados à composição microbiana de suas provisões alimentares e outros elementos do ninho. São também incipientes os trabalhos envolvendo a descrição da microbiota da própria abelha. Assim como na maioria dos animais, nas abelhas as comunidades microbianas são mais abundantes no trato digestório e podem afetar o seu potencial nutricional e imunológico, bem como outros aspectos fisiológicos (ENGEL e MORAN, 2013).

O conhecimento dos microrganismos simbióticos contribui para o entendimento das relações ecológicas que garantem a homeostase da colônia bem como fornece ferramentas para a prospecção de produtos de interesse biotecnológico como substâncias com propriedades antibióticas e conservantes (MENEZES, 2015).

Os resultados desta pesquisa contribuem com dados inéditos que podem servir para o entendimento das relações simbióticas existentes em colônias de abelhas *Melipona quadrifasciata anthidioides* da região semiárida. A investigação da diversidade bacteriana associada a essas abelhas é um ponto de partida fundamental para os avanços nos estudos em microbiota dessas espécies sem ferrão, esta inquirição serve como fonte de informação para novos estudos com abelhas sociais nordestinas.

Em trabalho realizado por Hervatin (2009) concluiu-se que os bolores e leveduras são os parâmetros microbiológicos mais significativos para produto das abelhas, seguido por *Bacillus cereus* e por bactérias coliformes totais, sendo parâmetros que devem ser introduzidos na legislação. Apesar da Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2001) fixar o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos, ocorre uma dificuldade prática de localização da melhor categoria que enquadre corretamente este produto.

Estes resultados ainda toam como referência para futuros trabalhos de qualidade da matéria prima desta natureza. Contribuem para o estabelecimento de parâmetros na elaboração de uma legislação específica, como Procedimentos de Identidade e Qualidade (PIQ) da geoprópolis de produtos das abelhas nativas brasileiras (melíponas).

Tabela11: Quantificação de microrganismos nas diferentes amostras de geoprópolis *in natura* da *Melipona. q. anthidioides*.

MICROORGANISMO	AM 1	AM 2	AM 3	AM 4	AM 5	AM 6	AM 7	AM 8	AM 9	AM 10
<i>Bacillus cereus</i> (UFC/g)	6,0 x 10 ²	5,0 x 10 ²	9,6 x 10 ²	<1,0 x 10 ²	<1,0 x 10 ²	<1,0 x 10 ²	3,0 x 10 ²	<3,0 x 10 ²	1,0 x 10 ²	<1,0 x 10 ²
<i>Bactérias aeróbias mesófilas</i> (UFC/g)	1,3x 10 ³	1,5 x 10 ³	1,3 x 10 ³	1,7 x 10 ³	1,3 x 10 ³	9,8 x 10 ²	1,3 x 10 ³	1,3 x 10 ³	1,2 x 10 ³	1,9 x 10 ³
<i>bolores e leveduras</i> (UFC/g)	4,8 x 10 ²	7,5 x 10 ²	5,1 x 10 ²	3,0 x 10	4,2 x 10	3,5 x 10	5,7 x 10 ²	5,7 x 10 ²	8,1 x 10 ²	2,0 x 10
<i>Clostrídios sulfito redutores a 46°C</i> (UFC/g)	<1,0 x 10	<1,0 x 10	<1,0 x 10	<1,0 x 10	<1,0 x 10	<1,0 x 10	<1,0 x 10	<1,0 x 10	<1,0 x 10	<1,0 x 10
<i>Coliformes a 45 °C</i> (NMP/g)	4,6 x 10 ²	>1,1 x 10 ³	< 3,0	< 3,0	< 3,0	< 3,0	< 3,0	< 3,0	2,1 x 10 ²	<3,0
<i>Escherichia coli</i> (NMP/g)	<3,0	4,0	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
<i>Estafilococos coagulase positiva</i> (UFC/g)	<1,0 x 10 ²	<1,0 x 10 ²	<1,0 x 10 ²	<1,0 x 10 ²	<1,0 x 10 ²	<1,0 x 10 ²	<1,0 x 10 ²	<1,0 x 10 ²	<1,0 x 10 ²	<1,0 x 10 ²
<i>Salmonella sp</i>	ausência em 25g	ausência em 25g	ausência em 25g	ausência em 25g	ausência em 25g	ausência em 25g	ausência em 25g	ausência em 25g	ausência em 25g	ausência em 25g

Fonte: dados da pesquisa

4.3 Desempenho analítico

A validação analítica é uma etapa importante no desenvolvimento de métodos, pois fornece parâmetros para a confiabilidade dos resultados. Um teste de recuperação do procedimento analítico foi realizado para os elementos em estudo a partir de uma amostra da geoprópolis (número cinco) devido à sua massa disponível e foram obtidos valores de recuperação na faixa de 92 a 105%.

Os resultados (Tabela 12) mostraram boa concordância com os valores de referência do CRM 1570a (para Cd, Cu, Mn, Ni e Zn) e teste de recuperação e adição (5µg) para outros elementos. No nível de confiança de 95%, o teste t pareado revelou que não houve diferença significativa entre os valores obtidos e os certificados ($p > 0,05$).

A precisão foi examinada sob condições de repetibilidade e reprodutibilidade e, valores inferiores a 10% indicaram a boa precisão desse método. LODs e LOQs obtidos para macro e microelementos determinados pelo ICP OES são mostrados na Tabela 12. O LOD obtido é semelhante ou melhor do que o encontrado para alguns métodos relatados na literatura para determinar minerais em produtos de abelhas sem ferrão.

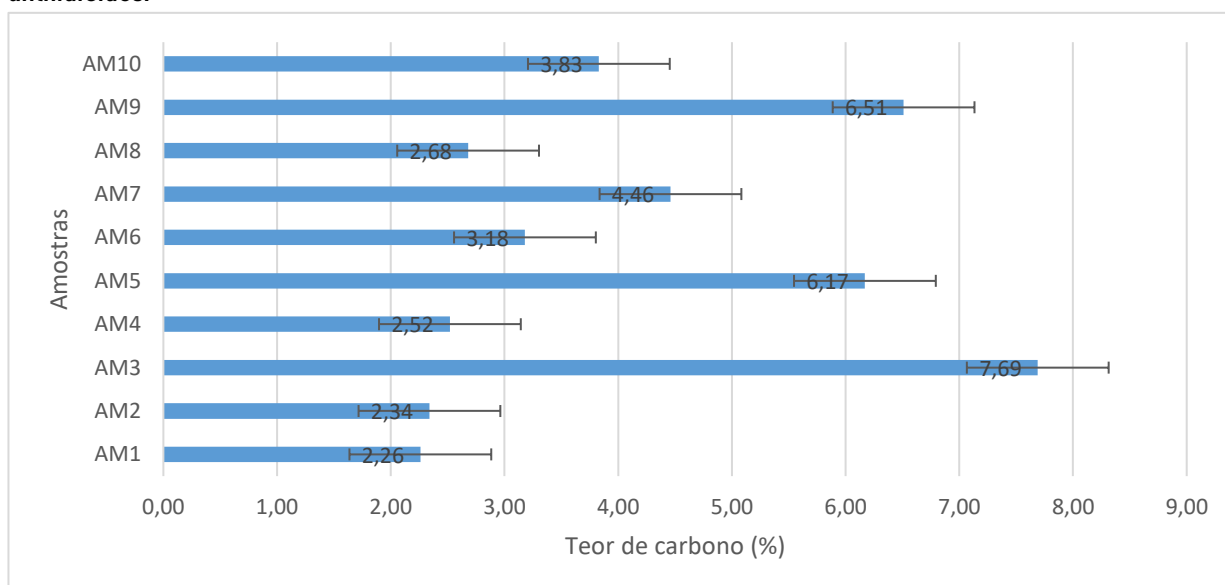
Tabela 12: Análise das folhas de espinafre (Material de Referência Certificado - CRM 1570a) e Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), em mg / kg, pelo ICP OES após digestão assistida em microondas (média \pm desvio padrão; n = 3; Nível de confiança de 95%)

Elemento	Valor certificado* (mg/Kg) ou adicionado (5 µg)	Determinado (mg/Kg)	Recuperação (%)	LOD (mg/Kg)	LOQ (mg/Kg)
Al	5	4.90 \pm 1.55	98.0	0.703	2.101
As	5	4.59 \pm 0.96	91.8	1.510	3.964
Ba	5	4.85 \pm 0.70	97.0	1.580	4.530
Ca	10	9.67 \pm 0.81	96.7	0.470	1.513
Cd	2.89* \pm 0.07	2.83 \pm 0.09	97.9	0.012	0.033
Co	5	4.87 \pm 0.37	97.4	0.106	0.349
Cr	5	4.98 \pm 0.22	99.6	0.230	0.767
Cu	12.2* \pm 0.60	11.9 \pm 0.04	97.5	0.009	0.022
Fe	5	5.23 \pm 0.18	104.6	0.720	2.240
K	10	9.86 \pm 0.93	98.6	2.503	7.706
Mg	10	9.97 \pm 0.74	99.7	0.108	0.410
Mn	75.9* \pm 1.90	76.1 \pm 0.68	100.2	0.032	0.071
Mo	5	4.77 \pm 1.28	95.4	0.205	0.816
Na	10	9.47 \pm 0.98	94.7	1.513	4.702
Ni	2.14* \pm 0.10	2.08 \pm 0.03	97.2	0.401	1.315
P	10	9.63 \pm 0.97	96.3	4.804	12.270
Pb	5	4.81 \pm 1.03	96.2	0.380	1.190
Sb	5	4.77 \pm 1.17	95.4	0.217	0.901
Se	5	4.99 \pm 0.80	99.8	0.110	0.406
Si	5	4.79 \pm 1.92	95.8	8.302	32.207
Sn	5	4.88 \pm 1.06	97.6	0.715	1.984
Sr	5	4.83 \pm 0.51	96.6	0.107	0.320
V	5	4.84 \pm 0.37	96.8	0.204	0.718
Zn	82.00* \pm 3.00	81.8 \pm 0.11	99.8	0.025	0.074

Os coeficientes de inclinação das curvas analíticas de cada elemento foram obtidos e comparados e não apresentou variação significativa, com 95% de confiança. Portanto, não foram observados efeitos da matriz para medidas de elementos múltiplos no ICP OES sob as condições selecionadas.

O teor de carbono residual variou de $2,25 \pm 0,15\%$ ($n = 3$). (gráfico 8) Este conteúdo mostra uma boa eficiência na digestão da matéria orgânica das amostras usando os métodos de preparação propostos Costa et.al, (2001).

Gráfico 8: Teor de carbono em porcentagem (m/m) na digestão do geoprópolis da *Melipona quadrifasciata anthidioides*.



4.3.1 Determinação de multi elementos na geoprópolis

Após validação do método proposto e otimização dos parâmetros instrumentais, o conteúdo (mg/Kg) dos elementos (Al, As, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, K, Pb, Sb, Se, Si, Sn, Sr, V e Zn) foram determinados na geoprópolis pelo ICP OES, representando a média da análise replicada (Tabelas 13 e 14).

Tabela13: Concentração (mg/Kg) de microelementos no geoprópolis da *Melipona quadrifasciata anthidioides* (média ± desvio padrão, n = 3, 95% nível de confiança)

Amostras	Al	As	Ba	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Mo	Ni	Pb	Sb	Se	Si	Sn	Sr	V	Zn
AM1	36,911.11 ± 564.24	4.37 ± 0.39	211.11 ± 13.49	<LoQ	14.12 ± 0.75	38.07 ± 1.31	24.17 ± 0.68	21,973.96 ± 618.01	200.51 ± 9.40	<LoQ	16.69 ± 0.90	8.55 ± 1.28	1.64 ± 0.55	<LoQ	150.77 ± 33.80	15.51 ± 1.95	13.50 ± 0.76	76.73 ± 5.18	39.18 ± 2.63
AM2	30,164.22 ± 153.23	<LoQ	38.36 ± 1.43	<LoQ	0.36 ± 0.03	25.30 ± 1.93	15.10 ± 0.91	11,536.47 ± 507.48	127.21 ± 6.63	<LoQ	5.42 ± 0.26	6.29 ± 0.60	<LoQ	<LoQ	<LoQ	10.04 ± 0.58	14.73 ± 0.41	28.77 ± 1.29	50.30 ± 3.49
AM3	21,591.44 ± 331.58	<LoQ	62.40 ± 1.41	<LoQ	0.44 ± 0.29	17.86 ± 1.73	12.91 ± 0.43	12,918.26 ± 193.30	63.74 ± 3.97	<LoQ	2.92 ± 0.29	3.45 ± 0.34	<LoQ	<LoQ	<LoQ	6.25 ± 0.00	11.82 ± 1.23	36.72 ± 3.84	43.69 ± 9.33
AM4	26,436.80 ± 926.99	<LoQ	130.33 ± 13.07	<LoQ	2.55 ± 0.34	24.15 ± 1.91	18.46 ± 0.55	15,528.16 ± 551.46	130.31 ± 13.89	<LoQ	7.36 ± 0.68	5.75 ± 0.22	<LoQ	1.01 ± 0.43	<LoQ	10.16 ± 0.30	22.73 ± 2.42	58.60 ± 3.99	40.54 ± 0.25
AM5	21,962.69 ± 905.45	<LoQ	123.67 ± 9.73	<LoQ	3.53 ± 0.01	24.46 ± 1.29	22.75 ± 2.10	15,591.33 ± 491.67	166.29 ± 4.73	<LoQ	10.18 ± 0.56	5.91 ± 0.50	1.34 ± 0.77	<LoQ	<LoQ	9.46 ± 1.89	30.85 ± 2.45	57.66 ± 5.43	40.74 ± 2.39
AM6	31,367.29 ± 623.55	<LoQ	114.87 ± 7.42	<LoQ	2.09 ± 0.01	32.59 ± 1.48	19.43 ± 1.46	20,137.31 ± 686.45	67.82 ± 3.78	<LoQ	7.03 ± 0.28	8.15 ± 1.24	1.40 ± 0.61	<LoQ	<LoQ	15.74 ± 1.08	10.05 ± 0.13	75.61 ± 1.78	30.16 ± 0.90
AM7	23,563.39 ± 018.25	<LoQ	109.00 ± 6.14	<LoQ	4.28 ± 0.14	24.31 ± 2.25	17.20 ± 0.73	15,052.21 ± 601.59	171.62 ± 7.21	<LoQ	9.74 ± 0.73	4.17 ± 0.11	1.52 ± 0.36	<LoQ	<LoQ	8.76 ± 0.90	24.82 ± 1.83	63.07 ± 0.13	41.68 ± 2.25
AM8	28,745.41 ± 04.93	<LoQ	146.63 ± 3.62	<LoQ	12.04 ± 0.57	34.87 ± 1.71	28.73 ± 1.27	20,022.11 ± 842.87	310.51 ± 75.21	<LoQ	21.74 ± 1.77	7.14 ± 0.31	<LoQ	<LoQ	<LoQ	16.15 ± 0.10	36.29 ± 2.88	78.26 ± 5.30	50.31 ± 0.60
AM9	20,414.40 ± 758.32	<LoQ	185.41 ± 5.79	<LoQ	4.70 ± 0.35	20.87 ± 1.27	22.52 ± 0.14	14,074.91 ± 445.40	166.12 ± 5.40	<LoQ	9.25 ± 0.76	3.85 ± 0.14	<LoQ	<LoQ	<LoQ	11.65 ± 1.30	35.80 ± 0.24	56.81 ± 2.35	32.16 ± 0.01
AM10	23,463.85 ± 906.38	<LoQ	69.69 ± 4.19	<LoQ	<LoQ	17.41 ± 0.72	10.63 ± 0.36	12,804.31 ± 72.99	50.51 ± 1.61	<LoQ	2.28 ± 0.20	3.89 ± 0.41	<LoQ	<LoQ	<LoQ	4.92 ± 0.20	9.21 ± 0.95	41.23 ± 0.96	24.34 ± 0.63
a	43589.61	695.92	1484829.72	48417.08	11447.37	6964.09	34304.58	26419.21	271162	5196.54	8285.28	1682.34	1482.76	504.97	3533.81	2116.92	3481765.76	59331.17	30835.87
b	4337.11	46.11	159748.63	1908.62	349.2	291.29	981.2	992.21	10116.25	214	372.72	135.8	65.86	35.05	142915.69	147.2	423640.4	1559.62	242.79
R ²	0.9991	0.999	0.999	0.9998	0.9994	0.9997	0.9994	0.9996	0.9994	0.9998	0.9996	0.9997	0.9996	0.9986	0.3724	0.9997	0.9991	0.9997	0.9989

a: coeficiente angular b: coeficiente linear; R²: coeficiente de determinação; LoQ: limite de quantificação/ Fonte: autor

Tabela 14: Concentração (mg/Kg) de macro elementos e carbono (%) geoprópolis da *Melipona quadrifasciata anthidioides* (média \pm desvio padrão, n = 3, 95% nível de confiança)

Amostras	Ca	K	Mg	Na	P
AM1	945.27 \pm 38.34	9,198.91 \pm 325.07	6,414.13 \pm 25.19	340.46 \pm 6.07	16.64 \pm 4.58
AM2	2,985.35 \pm 119.01	1,974.38 \pm 111.89	1,549.62 \pm 64.60	154.55 \pm 4.94	29.96 \pm 5.44
AM3	1,773.97 \pm 134.57	4,814.62 \pm 164.00	2,487.50 \pm 93.64	238.14 \pm 14.51	24.90 \pm 5.05
AM4	2,546.09 \pm 181.89	5,530.29 \pm 242.04	3,675.38 \pm 170.24	282.84 \pm 1.96	21.02 \pm 3.35
AM5	3,387.67 \pm 93.96	6,347.64 \pm 51.52	5,218.57 \pm 562.95	222.62 \pm 13.86	51.07 \pm 6.38
AM6	672.38 \pm 115.16	5,999.34 \pm 277.80	4,204.29 \pm 53.50	215.17 \pm 18.49	19.74 \pm 5.43
AM7	2,721.04 \pm 63.23	6,192.94 \pm 223.20	4,506.66 \pm 192.35	293.67 \pm 11.62	16.59 \pm 2.34
AM8	2,843.13 \pm 200.15	8,555.88 \pm 301.93	7,481.79 \pm 266.80	277.06 \pm 15.58	17.82 \pm 3.40
AM9	2,791.75 \pm 19.20	5,166.39 \pm 56.48	4,198.57 \pm 81.43	249.62 \pm 23.23	33.60 \pm 6.43
AME10	1,256.26 \pm 72.41	4,045.15 \pm 142.95	1,961.17 \pm 60.31	161.57 \pm 2.64	33.04 \pm 7.02
a	55583.72	61956.53	14461.61	373706.37	1340.51
b	737058.9	263689.35	74720.97	756769.82	84.81
R ²	0.993	0.999	0.9985	0.9963	0.9997

a: coeficiente angular b: coeficiente linear; R²: coeficiente de determinação; LoQ: limite de quantificação /Fonte: autor

O conteúdo de macro- (Ca, K, Mg, Na e P), microelementos essenciais (Ba, Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Se, Si, Sr, V, Zn) e elementos potencialmente tóxicos (Al, As, Cd, Cr, Ni, Pb, Sb e Sn), na geoprópolis da *Melipona q. anthidioides*, variaram entre as colônias.

As concentrações obtidas para Cd e Mo em todas as amostras ficaram abaixo do LOQ. Como a geoprópolis é parcialmente produzida do solo entorno do meliponário, além de conter uma mistura de cera, resina e argila, é bastante importante uma avaliação de elementos essenciais e potencialmente tóxicos, pois uma geoprópolis pode dar características diferentes aos produtos derivados da colônia.

Além disso, quantidades de metais litogênicos e antropogênicos podem indicar que a geoprópolis contém alguns analitos e, portanto, após passar por processo de esterilização ser considerada uma fonte nutricional suplementar em formulações para ração animal e servir como um bom indicador de contaminação ambiental em solos e áreas urbanas.

De acordo com a Tabela 12, Al (20.414,40 a 36.911,11 mg / kg) e Fe 11.536,47 a 21.973,96 mg / kg) apresentaram as maiores concentrações nas amostras de geoprópolis. O alumínio é um dos metais mais abundantes na crosta terrestre. Sua disponibilidade depende do pH do solo e, dependendo da concentração do metal, pode promover condições de crescimento e espécies vegetais (QUINTAL, MAGAÑA, *et al.*, 2017).

Por outro lado, apesar de abundante, o Al não possui papel biológico e é considerado um elemento potencialmente tóxico para os organismos vivos. O alumínio pode se distribuir por todo o organismo com acúmulo nos ossos, rins e cérebro. Dependendo das concentrações, promove disfunção renal, distúrbios hemopoiéticos e alterações neurocomportamentais (KREWSKI, YOKEL, *et al.*, 2007) (EXLEY, 2013).

Ferreira et al (2019) encontraram traços de alumínio em amostras de geoprópolis do sul do Brasil por espectrometria de massa indutivamente acoplada com plasma (ICP-MS), na faixa de 12.701,53 a 25.018,75 mg / kg.

A disponibilidade de Fe depende do potencial redox do solo e do pH (MORRISSEY e GUERINOT, 2009). O Fe está presente, aproximadamente 70%, na hemoglobina e, em menor grau, nas enzimas e mioglobina. É importante para a manutenção da homeostase celular, incluindo o transporte de oxigênio e elétrons e a síntese de ácidos nucleicos (ABBASPOUR, HURRELL e KELISHADI, 2014). Altas concentrações de Fe em geoprópolis e outros produtos, como própolis, foram relatadas na literatura.

O ferro foi um dos elementos com as maiores concentrações em amostras de própolis croata e suas tinturas, na faixa de 12,06 a 932,6 mg/100g por espectrometria de absorção atômica (CVEK e ET.AL., 2008). Korn et al. (2013) analisaram a própolis brasileira pelo ICP OES e determinaram uma concentração média de ferro de 120 mg/kg. Bonsucesso et al. (2018) relataram altas concentrações de Fe na geoprópolis (8.100 a 15.500 mg/Kg) pelo ICP OES e, atribuídas à sua abundância natural no solo incorporado na geoprópolis. Nesta pesquisa, os níveis de Fe foram encontrados de acordo com esses autores para amostras da geoprópolis.

O conteúdo de macrossoluto (Ca, K, Mg, Na e P) variou de 16,59 mg/Kg para P 9198,91 mg/Kg para K em amostras de geoprópolis. Os macrossoluto são nutrientes essenciais das plantas e seus níveis totais e disponíveis no solo dependem de minerais e outros fatores (estações, restos de organismos mortos, deposição de água nas copas das árvores, deposição de águas pluviais e fertilizantes (LEMANOWICS, 2018).

Os níveis séricos são de apenas 0,1 a 0,2% de cálcio extracelular e o conteúdo restante de Ca é armazenado no osso. Uma ingestão adequada de cálcio na dieta tem sido associada à prevenção de distúrbios hipertensivos (inclusive na gravidez), osteoporose, adenomas colorretais e redução dos níveis de colesterol das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (MOE, 2008) (CORMICK e BELIZÁN, 2019).

O magnésio está envolvido como cofator em mais de 300 sistemas enzimáticos e é importante na contração do citoesqueleto celular, produção de energia, síntese de ácidos nucléicos e, portanto, pode alterar a função do músculo esquelético e cardíaco (SCHWALFENBER e GENUIS, 2017).

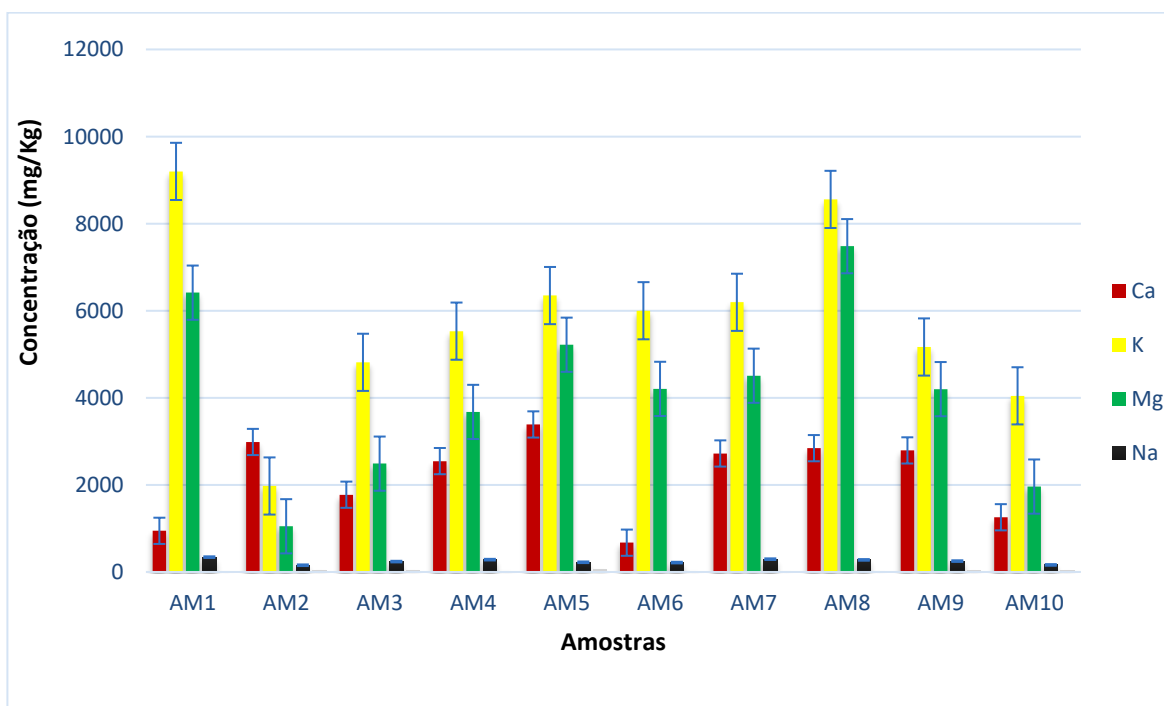
Assim como o cálcio (Ca) e o magnésio (Mg), o fósforo (P) é essencial para o metabolismo ósseo humano e animal e a função neuromuscular. Outras funções fisiológicas normais, incluindo conteúdo e função de fosfolipídios da membrana celular, sinalização celular e até agregação plaquetária dependem do fósforo inorgânico (MOE, 2008).

O sódio está envolvido na manutenção da homeostase celular normal, no equilíbrio de líquidos e eletrólitos e na pressão sanguínea (STRAZZULLO e LEDERCQ, 2014). Souza et al., (2016) analisaram amostras de própolis brasileira de *Apis mellifera* Linnaeus por espectrometria de absorção atômica e concluíram que variações sazonais influenciavam o conteúdo de 5 minerais (Mg, Fe, Na, Ca e Cu).

Ferreira et al. (2019) determinaram potássio, magnésio e sódio em amostras de geoprópolis, na faixa de concentrações de 555,02 - 2268,51, 401,27 - 2371.75 e 34,83 - 3395,43 mg / kg, respectivamente para K, Mg e Na. Neste estudo, os dados foram concordantes para Mg, no entanto, níveis mais altos que K e Na foram encontrados para amostras da geoprópolis analisadas.

Não foram encontrados dados na literatura para Ca e P em amostras de geoprópolis. O gráfico 9, mostra as variações das concentrações de macroelementos nas amostras de geoprópolis analisadas.

Gráfico 9: Concentrações de macroelementos (mg/Kg) em amostras da geoprópolis da *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Meliponinae) de Amélia Rodrigues, Estado da Bahia, Brasil / Fonte: autor



Micronutrientes (Ba, Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Se, Si, Sr, V e Zn) e elementos potencialmente tóxicos (Al, As, Cd, Cr, Ni, Pb, Sb e Sn) podem ser incorporados no solo das atividades da indústria (química, engenharia e mineração), bem como através da poluição urbana e ambiental. Além disso, a quimioterapia intensiva da agricultura baseada em pesticidas, fertilizantes e desinfetantes pode contribuir para a fortificação de solos e vegetais (PERUGINI, MANERA, *et al.*, 2011).

A Tabela 15 apresenta uma comparação entre os valores de concentração de elementos micro e potencialmente tóxicos em amostras de geoprópolis relatadas na literatura e neste estudo.

Tabela 15: Concentrações (em mg / kg) de elementos micro e potencialmente tóxicos em amostras da geoprópolis relatadas na literatura em comparação com este estudo.

Elementos	Bonsucesso et al. (2018)	Ferreira et al. (2019)	ESTA PESQUISA
Al	N.D.	14,757.58	26,462.06
As	N.D.	2.20	4.37*
Ba	45.20	N.D.	119.15
Cd	0.80	0.09	<LoQ (0.033)
Co	N.D.	15.91	4.90
Cr	32.80	28.12	25.99
Cu	5.10	60.94	19.19
Fe	13,200	34,746.51	15,963.90
Mn	N.D.	N.D.	145.46
Mo	1.7	N.D.	<LoQ (0.816)
Ni	5.6	8.75	9.26
Pb	5.2	12.25	5.72
Sb	N.D.	N.D.	1.48
Se	N.D.	1.50	1.01*
Si	N.D.	N.D.	150.77*
Sn	N.D.	N.D.	10.86
Sr	N.D.	N.D.	20.98
V	N.D.	124.07	57.35
Zn	7.3	44.17	39.31

N.D. não determinado; *: valor encontrado apenas em uma amostra. **Fonte: autor**

Estudos mostraram que a correlação entre a proporção de argila e a concentração de metais (cromo, chumbo, zinco e molibdênio) no solo é notável (SOUZA, 1996).

Na ausência de poluição (contribuição antrópica ou fontes naturais anômalas, como atividades vulcânicas e fontes termais), os níveis de concentração da maioria dos elementos são considerados pela litologia original e pelo efeito e magnitude do intemperismo (MOREIRA e BOAVENTURA, 2003).

Propriedades físico-químicas do solo, incluindo pH, condutividade elétrica, conteúdo de matéria orgânica e capacidade de troca catiônica são importantes para entender esse processo de transferência.

Carvalho et. al. (2010), quantificaram pelo ICP OES o teor de metais (Mn 107,5 –160,7; Zn 22,6–31,6; Co 5,3–7,4; Cr 26,2–45,5 e Pb <LoQ – 17,0 mg/Kg) no solo de Amélia Rodrigues, no Recôncavo Região de Baiano, Brasil. Amostras de geoprópolis, analisadas neste estudo, foram coletadas no município de Amélia Rodrigues-Ba e os níveis de elementos concordaram com os encontrados pelos autores.

O Co desempenha um papel muito relevante no corpo humano, especialmente no controle da anemia, pois é o átomo central da cobalamina (PAUSTENBACH, TVERMOES, *et al.*, 2013). Nos solos, é considerado um contaminante causado principalmente pela atividade de mineração e fundição, uso de fertilizantes e espalhamento de iodo de esgoto (HAMILTON, 2000).

Este estudo mostrou uma concentração média próxima à encontrada por Carvalho et al. (2010) em solo de Amélia Rodrigues, na região do Recôncavo Baiano, Brasil. As fontes de emissão excessiva de molibdênio para o meio ambiente são mineração, biossólidos, fertilizantes, indústria metalúrgica, produção de ligas, catalisadores e carvão; e combustão de petróleo (ZABOROWSKA, KUCHARSKI e WYSZKOWSKA, 2016).

No solo, o teor de Mo está correlacionado com a presença de Cu, Fe, Al e teor de carbono orgânico (PYRZYŃSKA, 2007). A importância biológica do molibdênio baseia-se na co-formação do complexo de pterina, na ligação com enzimas que participam do metabolismo do nitrogênio e enxofre e na biossíntese de hormônios (MENDEL e BITTNER, 2006).

Bonsucesso et al. (2018) encontraram uma concentração média de molibdênio de 1,70 mg/Kg em amostras de geoprópolis de uma região urbano-industrial do Estado da Bahia, Brasil. Neste estudo, verificou-se que os níveis de Mo em todas as amostras investigadas estão abaixo do limite de detecção do ICP OES.

Interações de fatores geográficos e físicos podem afetar o teor de zinco e cobre do solo. O tratamento de solos com pesticidas à base de Cu e Zn tem sido utilizado na agricultura para aumentar o rendimento das culturas e pastagens, aumentando a concentração desses metais (NIELSEN, 2012) (KEIBLINGER, SCHNEIDER, *et al.*, 2018).

Cu e Zn são metais redox essenciais para as funções do corpo (cofatores enzimáticos para várias funções biológicas), mas podem ser metais potencialmente tóxicos, dependendo de suas concentrações. O Cu é necessário para a função de várias proteínas (superóxido dismutase, ceruloplasmina, lisil oxidase, citocromo c oxidase, tirosinase, dopamina-beta-hidroxilase, etc (ARREDONDO e NÚÑEZ, 2005).

A deficiência de zinco afeta os sistemas epidérmico, gastrointestinal, nervoso central, imunológico, esquelético e reprodutivo (ROOHANI, HURRELL, *et al.*, 2013).

Os níveis de Zn para amostras de geoprópolis (24,30–50,31 mg/Kg) estavam de acordo com os encontrados por Ferreira et al, (2010). Bonsucesso et al. (2018) determinaram o Zn, em concentrações médias baixas (7,30 mg / kg), em amostras de própolis de diferentes países (15,00–779,00 mg / kg).

Cantareli et al. (2011) quantificaram o conteúdo mineral da própolis bruta argentina, incluindo o cobre (Cu) e o zinco (Zn), por análise de ativação de nêutrons (NAA) e utilizaram análises quimiométricas, como um método útil para avaliar a origem e a rastreabilidade química da própolis.

O selênio (Se) tem um papel ativo como antioxidante e regulação do hormônio tireoideano e da função imunológica (RAYMAN, 2000). A biofortificação agrônômica é uma fonte de introdução de (Se) no solo em diferentes espécies, e sua concentração depende de fatores, como as fases

geocoloidais presentes no solo, o pH e o potencial redox (RAMKISSOON, DEGRYSE, *et al.*, 2019).

O vanádio (V) é usado em revelador fotográfico, agente secante (tintas e vernizes), pesticidas e corantes e pigmentos pretos, empregados pelas indústrias de cerâmica, impressão e têxtil (TREVINO, DÍAZ, *et al.*, 2019). Portanto, os resíduos industriais podem contaminar solos e, conseqüentemente, a geoprópolis e outros produtos derivados das colônias.

A toxicidade dos compostos de vanádio é baixa (irritação do trato respiratório, irritação local dos olhos, hemorragia nasal e conjuntivite (BARCELOUX e BARCELOUX, 1999). Neste estudo, as concentrações de vanádio variaram de 24,34 a 50,31 mg/Kg e o Se foi encontrado em apenas uma amostra da geoprópolis, em concentração semelhante à determinada por Ferreira *et al.*, (2019).

O dióxido de silício (SiO_2) é a forma comum de Si no solo e a solubilidade de todas as formas de Si é baixa e biogeoquimicamente imóvel (SAHEBI, HANAFI, *et al.*, 2015). O Si parece estar envolvido na saúde óssea (síntese e/ou estabilização do colágeno e mineralização da matriz), (JUGDAOHSINGH, 2007).

Bário (Ba) e estrôncio (Sr) são elementos abundantes na crosta terrestre (265 a 835 e 32 a 200 mg/kg de peso seco, respectivamente), dependendo do tipo de solo. Como o silício (Si), não é um elemento muito móvel no solo, pois forma sais insolúveis na água.

Esses elementos têm uma variedade de usos, como absorvedores em tubos eletrônicos, rodenticida, coloração de tinta e meios de contraste de raios-x. Ba e Sr podem se acumular e danificar ossos e dentes e causar danos à pele (ONG, YAP, *et al.*, 2013) (BILSKI, KRAFT, *et al.*, 2013), (GENUIS e BOUCHARD, 2012).

Os resultados desta pesquisa indicaram que a faixa de concentração de Ba (38,36 a 185,41 mg/Kg) encontrada nas amostras da geoprópolis foi inferior aos níveis encontrados na literatura. O Si foi encontrado em apenas uma amostra da geoprópolis, evidenciando sua baixa mobilidade no solo. Para

amostras de Sr em amostras de geoprópolis (9,21 a 36,29 mg/kg), este estudo mostrou concordância com os dados da literatura.

Elementos potencialmente tóxicos (como As, Cd, Cr, Mn, Ni, Pb, Sb, Sn e Zn) estão no solo associados a processos geoquímicos naturais e ações antropogênicas (atividades industriais, fertilizantes, pesticidas, biossólidos e adubos, águas residuais, metais), processos de mineração e moagem, resíduos industriais e fontes aéreas. Esses elementos não biodegradáveis são introduzidos e acumulados no solo de diferentes maneiras (BENSON, 2006).

Suas taxas de geração por ciclos artificiais são mais rápidas em relação aos naturais, e a forma química (espécie) em que um metal é encontrado no sistema ambiental receptor pode torná-lo mais biodisponível e causar efeitos nocivos aos seres vivos (D'AMORE, AL-ABED e SCHECKEL, 2005).

A Tabela 16, apresenta uma comparação dos valores obtidos neste estudo, com os encontrados na literatura para solos, bem como os principais efeitos desses elementos no organismo humano.

Tabela 16: Faixa de concentração do solo (em mg/kg) de elementos potencialmente tóxicos relatados na literatura em comparação com este estudo e efeitos principais no organismo humano.

Metal	Faixa de concentração no solo (literatura) (mg/Kg)	Geoprópolis faixa de concentração neste estudo (mg/Kg)	Efeitos principais no organismo humano
As	5.00–10.00	< LoQ–4.37	danos à pele, aumento do risco de câncer e problemas no sistema circulatório
Cd	0.10–345	< LoQ (0.033)	afeta várias enzimas, danos renais (proteinúria), disfunção renal e osteomalácia
Cr	0.05–3,950	17.41–38.07	irritação e úlceras (estômago e intestino delgado), anemia, esperma e danos no sistema reprodutor masculino
Mn	20–10,000	50.51–310.51	manganismo e efeitos neurológicos
Ni	20–30	2.28–16.69	hematotoxicidade, genotoxicidade e teratogenicidade, imunotoxicidade e carcinogenicidade
Pb	1.00–69,000	3.45–8.55	efeitos neurológicos, carcinogenicidade, lesão cerebral, glóbulos vermelhos e rins
Sb	0.06–1.03	< LoQ–1.64	diarréia, dermatite, aumento da pressão arterial e eletrocardiografia alterada
Sn	0–2.5	4.92–16.15	baixa toxicidade (citotoxicidade de compostos de estanho metilados)
Zn	150–5,000	24.34–50.31	, náusea, vômito, dor abdominal, anemia, leucopenia, neutropenia, aumento do colesterol plasmático função cardíaca anormal

Fonte: (HAMILTON, 2000); (WUANA e OKIEMEN, 2011); (BASU, SAHA, *et al.*, 2014); (LUCCHINI, PLACIDI, *et al.*, 2017); (ECHEVARRIA, MASSOURA, *et al.*, 2006); (LEWINSKA e KARCZEWSKA, 2019); (TCHOUNWOU, YEDJOU, *et al.*, 2012); (ZDROJEWICZ, POPOWICZ e WINIARSKI, 2016); (SUNDAR e CHAKRAVARTY, 2010); (DOPP, VON RECKLINGHAUSEN, *et al.*, 2011).

Neste estudo, os resultados obtidos mostraram a presença desses elementos nas análises da geoprópolis. Portanto, acredita-se que o solo próximo ao meliponário esteja contaminado com esses metais, que podem contaminar outros produtos das colônias.

Popov et al. (2017) determinaram concentrações relativas de metais potencialmente tóxicos em ordem decrescente (Zn > Cr > Cu > Pb > Cd) no solo da Macedônia. Os maiores valores médios para concentrações desses metais nos solos foram 72,03, 38,28, 26,64, 17,15 e 0,60 mg/kg para Zn, Cr, Cu, Pb e Cd, respectivamente.

Roman et al. (2011) determinaram por espectrometria de plasma a extensão (concentrações médias em mg / kg) da bioacumulação dos elementos tóxicos Zn (48,1), Cu (6,95), Pb (5,74), As (0,66) e Cd (0,19), em própolis e mel de origem multifloral coletados da Polônia.

Finger et al. (2014) determinaram onze metais representativos (Al, Ca, Cd, Cr, Cu, K, Mg, Mn, Na, Pb e Zn) em 42 amostras de própolis do Brasil por espectrometria de atomização eletrotérmica e absorção atômica por chama. Os autores sugeriram que a própolis é um bioindicador eficaz de contaminação ambiental em colmeias e arredores. Além disso, eles relataram que a ingestão diária de própolis não representava uma ameaça potencial para a saúde dos consumidores, uma vez que a concentração média de elementos potencialmente tóxicos (Cd, Cr e Pb) na própolis bruta era de 0,13, 5,53 e 9,85 mg / Kg, respectivamente.

A tabela 17 mostra o Limite máximo (IDA) de contaminantes inorgânicos em produtos alimentícios secos (PAS) e no mel, uma vez que não existe níveis seguros estabelecidos para a geoprópolis da *Melipona quadrifasciata anthidioides*, este são os níveis mais próximos para este produto.

Tabela 17: Limite máximo (IDA) de contaminantes inorgânicos em produtos alimentícios secos (PAS) e no mel

COMPOSTOS	Limite máximo de tolerância	
	(PAS)	MEL
Al (mg/kg/peso)	1*	-
As (mg/kg)	1,0***	0,30(mg/kg) ****
Hg (mg/kg)	1,0***	-
Pb (mg/dia)	2,0	0,30(mg/kg)****
Ni (mg/dia)	1**	-
Cd (mg/kg)	1,0***	0,40(mg/kg)****
Cr (ppm)	0,10**	-

*FAO/WHO, 1989, ** BRASIL, 1965,***BRASIL, 1998 e ****BRASIL,2013. Tabela com valores de referência de outros autores(autor)

Os resultados encontrados da concentração mg/Kg total dos macros e microelementos no geoprópolis da *Melipona quadrifasciata anthidioides* variaram entre as colônias. Foram quantificados (mg/Kg) os multielementos que apresentaram os seguintes valores (Al 320414,40-36911,1) (As <LD -4,37) (Ba 38,36-211,11) (Cd <LD) (Co <LD- 14,12) (Cr 17,41-38,07) (Cu 10,63-28,73) (Fe 21973,96- 11536,47) (Mn 50,51- 310,51) (Mo <LO) (Ni 2,28-21,74) (Pb 3,45-8,55) (Sb <LD-1,64) (Se <LD-1,01) (Si <LD- 150,77) (Sn 4,92-16,14) (Sr 9,21-36,29) (V 28,77-78,73) (Zn 24,34-50,31) (Ca 672,38-94527) (K 1974,38-9198,91) (Mg 1961,17-7481,79) (Na 154,55-340,46) (P 16,59-51,07).

Dentre os microelementos analisados o (Fe 21973,96- 11536,47 mg/Kg) e o (Al 320414,40-36911,1 mg/Kg) foram os que apresentaram os maiores níveis.

Korn (2013) analisou a própolis e verificou que o Fe (120mg/kg) também foi encontrado em maiores concentrações entre os metais estudados.

Estudo semelhante de Bonsucesso et al. (2018) mostrou que o Fe (13,200mg/kg) apareceu com uma maior quantidade em relação aos outros analisados na amostra de geoprópolis da *Melipona scutellaris*. Segundo o autor essa alta concentração de Fe neste produto pode ser atribuída à sua abundância natural no solo incorporado na geoprópolis.

Os dados encontrados por Carvalho et al. (2010) que quantificou o teor de metais em solos do Recôncavo da Bahia, especificamente, da cidade de

Amélia Rodrigues-BA, mostraram os valores: Fe 5,9 a 10,2g.Kg⁻¹, Al 41,7 a 110,7 g.Kg⁻¹ Mn 107,5 a 160,7 mg.Kg⁻¹, Zn 22,6 a 31,6mg.Kg⁻¹, Co de 5,3 a 7,4 mg.Kg⁻¹, Cr de 26,2 a 45,5 mg. Kg⁻¹, Pb de <LD a 17,0.

Os dados deste trabalho mostraram que o Fe e o Al estavam presentes em maiores níveis dentre os elementos quantificados. Estes resultados ratificam a informação de que os altos valores desses elementos encontrados podem estar associados aos altos teores desses metais no solo dessa região. Desta forma o Al, que apresentou níveis elevados (320414,40-36911,1 mg/kg) nesta pesquisa, pode ser um fator de contaminação para o mel destas abelhas.

Os níveis de concentração do Cr na geoprópolis analisada nesta pesquisa variaram de (17,41 - 38,07 mg/kg).

No trabalho de Bonsucesso et al. (2018) o Cr apresentou 32,8mg/kg, nível considerado elevado em relação aos demais elementos quantificados. O mesmo resultado foi refletido na análise do solo quando foi observado 30,7 mg/kg. Este autor também encontrou baixos níveis de Zn (7,3 mg/kg) comparado à própolis encontrada em diversos outros países (15-779 mg/kg). Os níveis de Zn encontrados neste trabalho variaram de (Zn 24,34-50,31 mg/kg).

Os principais elementos presentes na geoprópolis preparada pelas abelhas sem ferrão *Melipona scutellaris*, provenientes da Bahia foram As, Cd, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb e Zn. Este produto exibe padrão metálico semelhante ao solo entorno da colméia, o que explica a semelhança tanto entre a concentração de metais quanto a estrutura física dos dois materiais (BONSUCESSO e ET.AL., 2018).

Os elementos Al, Br, Ce, Co, Cr, Cu, Fe, La, Rb, Sb, Sc, Sn, Th, Zn foram identificados em própolis provenientes da Argentina e verificou que a análise de metais, acoplada à quimiometria, representa um método útil para avaliar a procedência da própolis e, desta forma, contribui para a rastreabilidade química deste produto (CANTARELLI, CAMIÑA, et al., 2011).

Os resultados deste trabalho Tabelas 13 e 14, corroboram com a literatura acima citada, uma vez que fornecem dados atributos ao geoprópolis

de uma espécie nativa brasileira endêmica da região Nordeste. O que pode servir de parâmetro para avaliar a qualidade da geoprópolis da *Melipona. q. anthidioides* e assim agregar valor aos produtos destas abelhas.

Segundo Souza, Zaluski e Orsi (2016) a avaliação da composição mineral da própolis contribui para o entendimento de sua qualidade; ele mostrou que não apenas as variações sazonais, mas também o método de coleta influencia o conteúdo mineral presente, e de micronutrientes como Zn e Fe.

Finger (2014), quantificou os elementos Al, Ca, Cd, Cr, Cu, K, Mg, Mn, Na, Pb em amostras de própolis do estado do Paraná. O autor relata neste trabalho que foi a primeira investigação extensa de metais em níveis traços na própolis brasileira. Os resultados sugeriram que a própolis é um bioindicador eficaz de contaminação ambiental nas colmeias e arredores. No entanto, a ingestão diária de própolis não representou uma ameaça potencial para a saúde dos consumidores.

Popov et al. (2017), analisando Cr, Pb, Zn, Cd e Cu em própolis da Macedônia verificou que eles apresentaram níveis aceitáveis de metais com potencialidade tóxica, de acordo com legislação e a organização internacional com níveis máximos permitidos para este produto.

Outro trabalho investigou Zn (14,8), Cd (nd), Pb (7,73) e Cu(2,45)mg/kg⁻¹ em amostras de própolis da Argentina (PIERINI, PINTO, *et al.*, 2017), comparando com os resultados encontrados nesse trabalho Zn:39,18, Cd:nd, Pb:8,55 e Cu:15,10 mg/kg verificou-se que Zn, Cu foram superiores enquanto que Cd e Pb apresentaram valores iguais e próximos, respectivamente.

Este trabalho apresentou uma maior quantidade de elementos analisados em relação aos trabalhos confrontados. Além disso, níveis de elementos específicos nas amostras da georópolis podem estar relacionados ao local da coleta e poderiam ser utilizados para atribuir a origem geográfica da geoprópolis.

Essas observações podem ser úteis ao produto, como um método químico complementar para rastreabilidade deste. Confirmando os dados

relatados por diversos outros autores os resultados desta pesquisa (tabela 18), figuram como pioneiros na determinação multi elementar e metais com potencialidade tóxica para a geoprópolis desta espécie.

Tabela 18: Comparativo de elementos encontrados em diversos trabalhos

Elementos	Dados geoprópolis desta pesquisa	BONSUCESSO, 2018 (geoprópolis <i>M. scutellaris</i> -BA)	SOUZA, 2016 (própolis <i>A. mellifera</i> - SP)	KORN, 2013 (própolis <i>A. mellifera</i> -BA)	CANTARELLI,2011 (Própolis <i>A. mellifera</i> Argentina)	BONVEHÍ e BERMEJO Própolis <i>A. mellifera</i> - Espanha	POPOV,2017 Própolis <i>A. mellifera</i> , Macedônia	ORSI,2018 Própolis <i>A. mellifera</i> Brasil	GONZÁLEZ-MARTÍN, 2018 própolis <i>A. mellifera</i> (Espanha, Portugal, Bélgica, Inglaterra, EUA e Chile)	AMBI,2017 Própolis <i>A. mellifera</i> – Rússia	FINGER,2014 Própolis <i>A. mellifera</i> - PR
Al	26462,06 (20414,40 - 36311,11)					(308-582)					0,68 (<LOD-1,84)
As	1,267 (<LOD - 4,37)				0,26 (0,10-0,60)	(<75-130)µg/kg					
Ba	119,15 (38,36 - 211,11)	45,20		0,82 (0,58-1,54)							
Cd	<LOD	0,80				(38-110)µg/kg	0,021 (0,013-0,029)	(LOD-0,20)			0,13 (<LOD-0,64)
Co	4,41 (<LOD - 14,12)				0,46 (0,25-0,70)	(<0,05-0,84)				<2,00	
Cr	26,00 (17,41 - 38,07)	32,80		1,02 (0,19-2,48)	2,93 (1,3-3,75)	(0,33-2,73)	0,025(0,012-0,038)	(<LOD-20,25)	(<LOD-11,55)		5,53 (<LOD-19,3)µg.g
Cu	19,20 (10,63 - 28,73)	5,10	8,06 (4,2-12,24)	0,64 (0,42-0,79)		(2,08-4,72)	0,022 (0,0170,028)		(<LOD-6,10)	>4,00	<LOD
Fe	15963,90 (11536,47 - 21973,96)	13200,00	292,55 (156,2-459,5)	74 (45-96)	742 (400,0-1930,0)	(312-1,270)				>4,00	
Mn	145,46 (50,51 - 310,51)			4,58(2,61-6,64)		(6,42-27,1)				<LOD	0,08(<LOD-0,17)
Mo	<LOD	1,70									
Ni	9,26 (2,28 - 21,74)	5,60		0,68 (0,50-1,12)		(0,64-3,65)		<LOD-42,5)	(<0,05-7,10)		
Pb	5,72 (3,45 - 8,55)						0,036(0,034-0,044)	(<LOD-6,88)	(<LOD-7,21)	<4,00	9,85 (<LOD-160,1)
Sb	0,65 (<LOD - 1,64)				0,06 (0,04-0,08)						
Se	0,10 (<LOD - 1,01)					(<64-106)					
Si	15,08 (<LOD - 150,77)					(479-897)					
Sn	10,86 (4,92 - 16,15)							(1,80-52,6)			
Sr	20,98 (9,21 - 36,29)										
V	57,35 (28,77 - 78,26)										
Zn	39,31 (24,34 - 50,30)	7,30	71,78 (30,8-113,5)	73 (52-86)	54,9 (14,5-105,0)	(163-1,364)	0,025(0,018-0,021)		(<LOD-113,92)	>8,00	0,02(<LOD-0,05)
Ca	2192,29 (1672,38 - 3387,67)		2415,9 (1423,8-3985,9)	468 (412-615)		(1,773-6,683)					1,66(<LOD-4,80)
K	5782,56 (1974,38		3453,7	240 (231-248)		(735-4,790)					7,59(0,41-54,9)

	- 9198,91)	(1809,9- 5321,5)			
Mg	4119,77 (1049,62 - 7481,79)	1184,5 (897,9- 1515,5)	197 (157-245)	(301-1,405)	1,27(0,50-4,65)
Na	243,57 (154,55 - 340,46)	228,85 (69,0- 404,1)	24 (11-40)	(93-225)	0,58(0,13-1,00)
P	26,44 (16,59 - 51,07)			(171-627)	

Fonte: autor

A análise dos principais componentes e o agrupamento hierárquico foram utilizados como análise exploratória. Foi construída uma matriz com 30 amostras e 18 variáveis, os dados foram escalonados automaticamente.

A concentração dos elementos nas amostras foi utilizada como matriz de resposta. As relações entre os metais na geoprópolis são verificadas na Análise de Componentes Principais (Gráfico 10). Os dois primeiros componentes principais representaram 74% da variação total. Observando – se o gráfico (PC1 x PC2), três grupos distintos são formados.

Gráfico 10: Gráfico de pontuação PC1 x PC2 obtido da geoprópolis

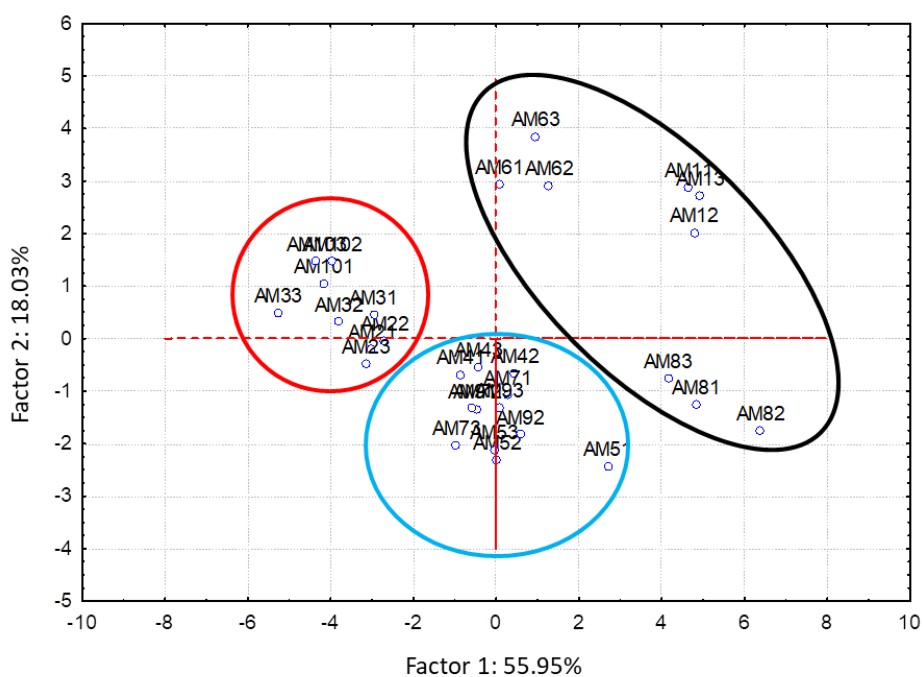
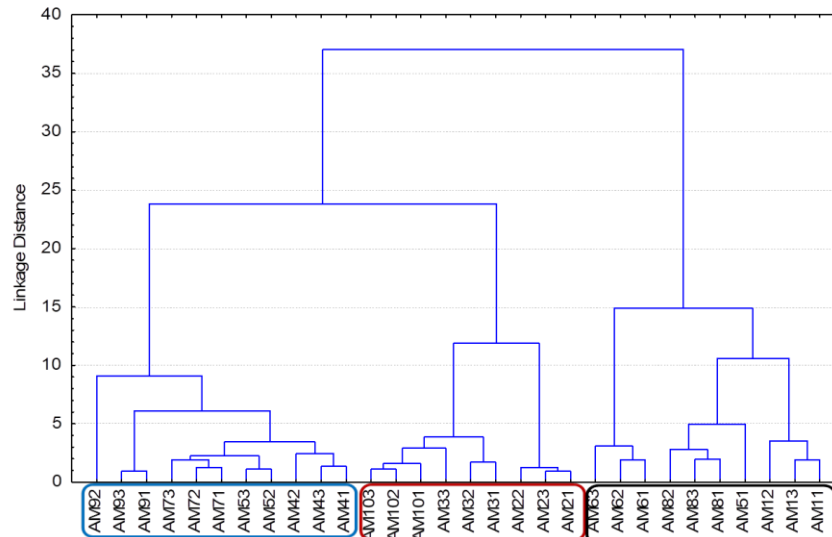


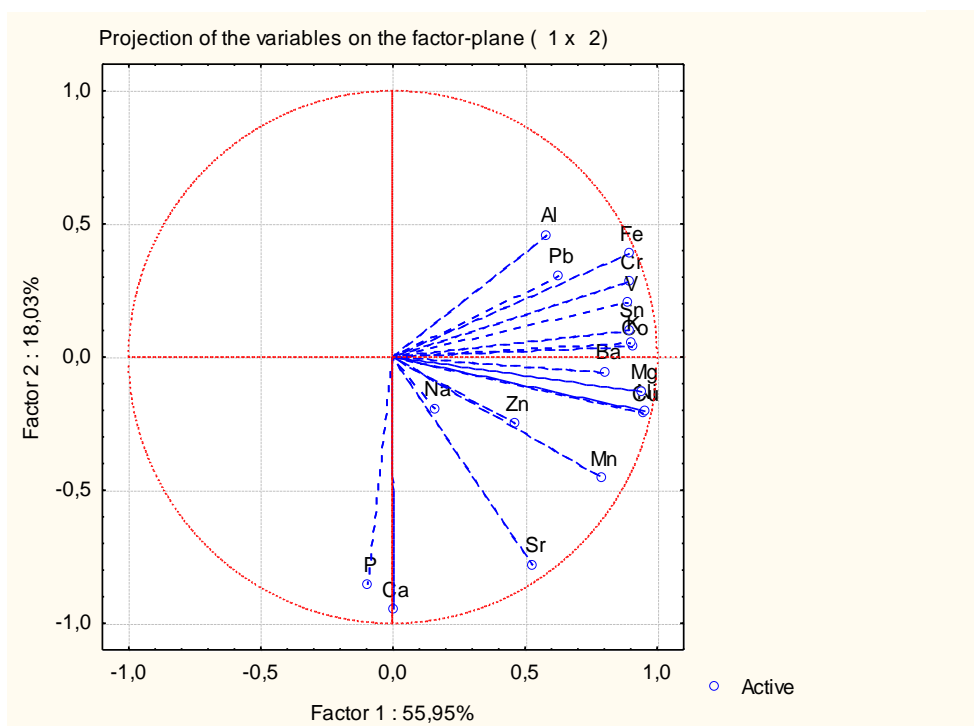
Gráfico 11: Dendrograma obtido a partir das amostras analisadas da geoprópolis. Distância Euclidiana e método de probabilidade entre pontos



A análise do dendograma permite mostrar que aproximadamente 90% das amostras possuem 85% de similaridade entre si, ou seja, a composição multielementar básica da geoprópolis das 10 colônias quando comparados praticamente não mudou. É necessário investigar se essa composição multielementar está presente nos 85% de similaridade ou nos 15% de diferença. O dendograma confirmou o PCA com a formação de 3 grupos principais.

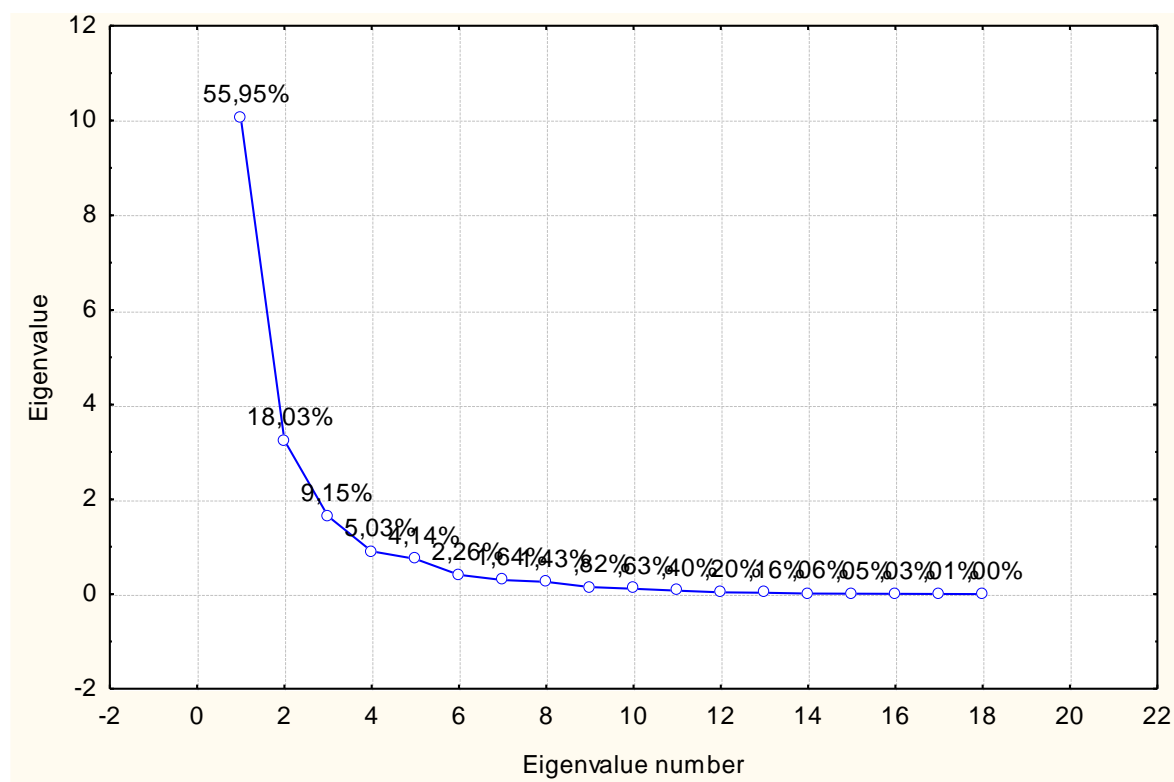
O gráfico 12 mostra a relação entre as variáveis e os PCs, o Fe e o Cr possuem pesos semelhantes entre uma determinada PC.

Gráfico 12: Projeção das variáveis



De acordo com o gráfico 13, pode-se correlacionar entre as variáveis. A partir dos dados apresentados na tabela 19, pode-se observar que o Co tem correlação positiva com o Cu, Ni, K, Fe e Mg. O Cr se correlaciona positivamente com o Fe e o Sn. O cobre mostrou correlação positiva com o Mn, Sn, V e Mg. O Fe se correlaciona com Sn, V, K e Mg. O Mg mostrou correlação positiva com N. O N com K e com Mg. O V mostrou correlação com o K e com o Mg. O Ca tem correlação com o P e K se correlaciona com o Mg. Estes resultados podem ser explicados pela diferença fisiológica da planta em relação aos metais ou pela própria fisiologia da abelha em relação a afinidade com certos metais.

Gráfico 13: Valores da matriz de correlação



Os resultados desta seção resultaram na publicação de um artigo científico no jornal "Biological Trace Element Research" DOI: 10.1007 / s12011-020-02455-7, (APÊNDICE W).

4.4 Produção de extratos

Assim como para a própolis produzida por abelhas africanizadas, o método de preparo dos extratos da geoprópolis pode influenciar sua atividade, uma vez

que os diferentes solventes solubilizam e extraem compostos diferentes (CUNHA, SAWAYA, *et al.*, 2004).

Os parâmetros estabelecidos para a extração da geoprópolis preparada pela abelha *Melipona quadrifasciata anthidioides* são fundamentais e definem a composição o teor de metabólitos secundários e a atividade biológica destes extratos. O solvente extrator escolhido precisa ser o mais seletivo possível essa seletividade depende do grau de polaridade das substâncias presentes na matriz a qual se deseja extrair. Quando não se conhece as características das substâncias presentes em determinada amostra estudada, utiliza-se normalmente extração com solventes de diferentes polaridades, a fim de agrupar em cada solvente utilizado, diferentes grupos de constituintes químicos.

Durante a pesquisa bibliográfica, observou-se que a maioria dos parâmetros empregados são fundamentados em métodos já descritos para a própolis derivada de *Apis mellifera*. Embora a composição de ambas seja distinta, sendo necessária a avaliação de métodos que favoreçam o rendimento e perfil químico das extrações da geoprópolis destas abelhas sem ferrão.

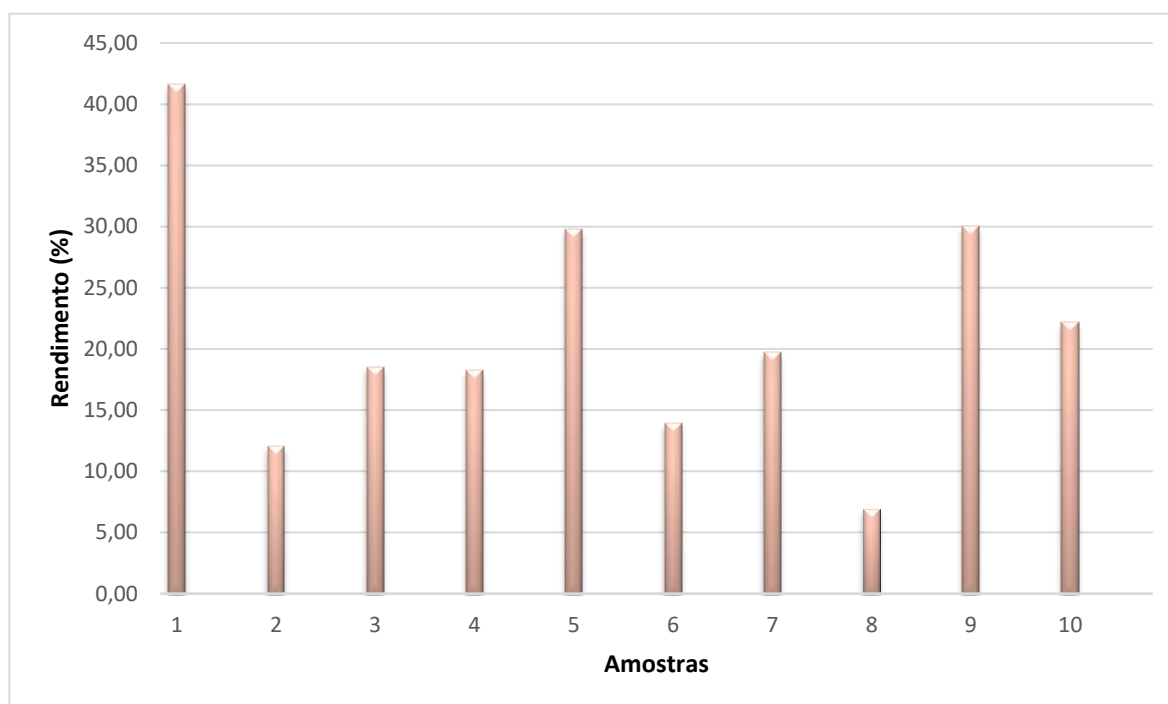
Para a própolis de *Apis*, de acordo com a IN n° 3/2001, o extrato deve ter, no mínimo, 11% de extrato seco, ou seja, 110 gramas de matéria-prima para preparar 1kg de infusão. Pode apresentar uma concentração maior dependendo da demanda mercadológica ou da característica da marca. Infelizmente, ainda temos poucas referências sobre o efeito de extratos de própolis de abelhas sem ferrão elaborados com diferentes extratos secos em diferentes concentrações.

Com base em conhecimento empírico, nos produtos disponíveis no mercado e em algumas publicações científicas que já testaram a ação de extratos de própolis de abelhas nativas, é possível afirmar que essa referência de 11% se aplica bem à própolis de abelhas sem ferrão bruta (produzida por *Scaptotrigonas*, por exemplo), mas não ao geoprópolis e ao cerume, que têm uma concentração menor da substância em sua composição seca. Para essas matérias-primas, têm sido utilizadas concentrações que variam entre 20% e 40%. (VILLAS-BÔAS, 2018).

Alguns trabalhos estudaram extratos de própolis preparados apenas com água como solvente e extratos preparados com uma mistura de água e álcool. Além disso, outros solventes têm sido testados como o propileno glicol e a glicerina (PARK., K, *et al.*, 1998).

Convencionou-se a utilização do etanol 96% e o rendimento médio das extrações bruta do geoprópolis da *Melipona quadrifasciata anthidioides* variou de 6,92% a 41,63% dentro das colônias investigadas como pode ser observado no gráfico 14.

Gráfico 14: Rendimento médio do extrato etanólico do geoprópolis x colônia



Cardozo e colaboradores (2015), realizaram extração da própolis produzida por Jataí, Mandaçaia e Mandurí por maceração em EtOH 100%, e obtiveram rendimentos que variaram de 7- 95% em amostras da própolis, evidenciando a complexidade e influência da espécie de abelha na produção da resina.

Dentre os poucos estudos que avaliaram o sistema de extração de geoprópolis produzida por abelha sem ferrão, encontra-se o de Cunha et al., (2009), que desenvolveram e validaram método fundamentado na concentração

de flavonoides e fenólicos totais, em geoprópolis produzida pela *Melipona fasciculata* Smith. Os autores obtiveram rendimentos totais de 4.93% e 3.72%, aplicando a maceração e o soxhlet como técnicas extrativas em EtOH 70%, contudo a mudança na proporção de EtOH para 100% favoreceu o aumento no rendimento de metabólitos secundários para 8.43 e 4.83%, respectivamente.

Os rendimentos dos processos extrativos em amostras da geoprópolis obtidos por maceração em etanol a 70% (v/v) variaram entre 1,10 - 5,83%. Bankova, et al. (1998) submeteram amostras da geoprópolis de *Melipona compressipes*, coletadas no município de Picos-PI, a maceração em etanol a 70% (v/v), obtendo rendimento de 5% de extrato seco, enquanto amostras de geoprópolis de *Melipona quadrifasciata anthidioides* do município de Prudentópolis-PR, tiveram rendimento de 17%. Estudos realizados por Cunha et al (2004), indicam que o maior rendimento nos processos de extração de própolis por maceração ocorre nos sistemas onde a proporção de etanol é igual ou superior a 70% (v/v).

Park et al. (1998) revelaram que existe grande variação na concentração de flavonoides entre extratos dependendo da concentração etanólica utilizada para extração e esse fato, está intimamente relacionado com a sua atividade biológica.

A quantidade de ativos extraídos é essencial e pode indicar viabilidade no processo de elaboração de uma formulação farmacêutica. Desta forma a geoprópolis da *Melipona quadrifasciata anthidioides* se mostrou uma matéria prima viável, uma vez que os extratos apresentaram um valor de rendimento acima da média encontrada em outros trabalhos citados anteriormente.

4.5 Perfil químico

A identificação dos componentes químicos baseou-se na análise dos espectros obtidos entre 220 e 600nm pelo detector de arranjo de diodos nos tempos de retenção, comparados com os dos padrões injetados (Tabela 20).

Tabela 20: Parâmetros cromatográficos dos padrões analisados por HPLC (autor)

Padrões	tR (min)	UV bands
ác. gálico	0,93	230,36-269,94
catequina	7,76	234,83-277,16
ác clorogênico	9,07	240,69-310,64
ác. Cafeico	9,79	240,15-319,71
vanilina	10,52	238,51-267,77-304,99
ác. P-cumárico	12,38	235,98-269,80-305,01
ác. t-ferúlico	13,53	239,60-320,02
propilgalato	15,94	231,49-267,50
poligalina	16,62	240,17-268,29-306,63
rutina	16,66	263,49-355,82
naringenina	16,92	231,43-281,31
quercetina	22,56	243,75-264,59
Kampferol	25,86	264,89-362,27
kaempferide	30,91	264,78-364,30
artepelin-C	32,52	23745-313,27
aurapteno	33,58	238,41-305,35

Através dos cromatogramas apresentados nas figuras 31, 32, 33 e 34, pôde-se inferir que não houve grande variabilidade de compostos químicos identificados entre os diferentes solventes usados na partição uma vez que, algumas substâncias estão presentes em todos os cromatogramas. Contudo, ficou evidenciado alterações na intensidade dos picos. Algumas diferenças foram detectadas ao longo da corrida cromatográfica, quando levado em consideração picos majoritários. As diferenças podem ser observadas nas figuras supracitadas.

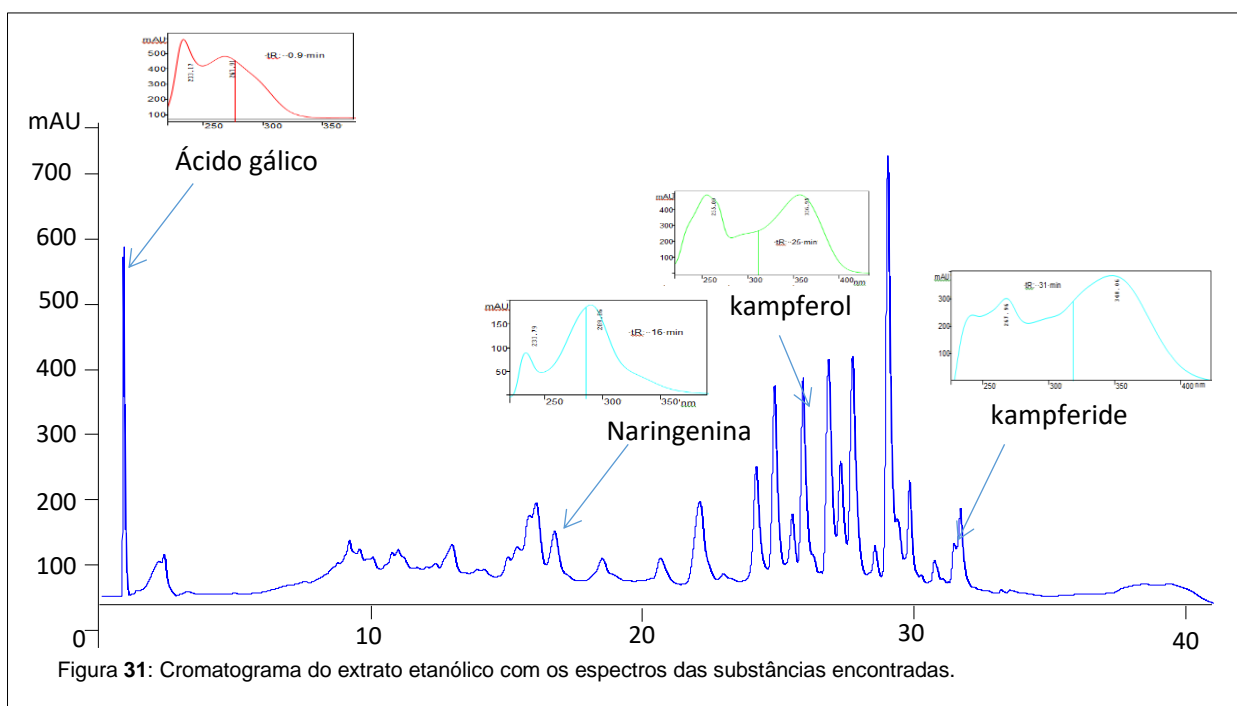
Os perfis de absorção ultravioleta do extrato etanólico, apresentados no (APÊNDICE H) demonstraram que as absorções máximas variaram de 230 a 360nm. Estas faixas de comprimentos de onda sugerem a predominância de compostos fenólicos neste extrato, uma vez que os mesmos absorvem na faixa entre 200 e 370 nm (CASTRO, CURY, *et al.*, 2007); (SILVA, PEREIRA, *et al.*, 2012).

Os compostos fenólicos podem apresentar duas bandas entre 200-300nm, como o ácido vanílico, com λ_{max} 258 e 294nm. Esta classe de metabólitos também pode apresentar uma única banda, a exemplo do ácido p-

hidróxi-benzóico, como λ_{max} de 282nm (TERMENTZI, KEFALAS e KOKKALOU, 2008)

A banda IIb, com máximo de absorção em 240-285nm, acredita-se ser resultante do anel A. Já a banda I, com máximo de absorção em 300-550nm, presume-se resultar do anel B. Flavonas, flavonóis e flavonóis glicosilados são usualmente detectados em comprimento de onda de 270nm, 365nm ou 370nm, embora detecções em 280 e 350nm têm sido usadas. O detector de arranjo de diodos é o mais utilizado nas publicações acerca de flavonoides em que se usa CLAE como técnica analítica (HUBER e AMAYA, 2008).

O perfil cromatográfico do extrato etanólico de geoprópolis mostrado na Figura 31 apresentou 22 picos majoritários. Dentre as substâncias que foram investigadas, comparando-se com os padrões representados na tabela 20, identificou-se: o ácido gálico, naringenina, kampferol e kaempferide.



No extrato etanólico da colônia 2 foram detectados 21 compostos com características de absorção da classe dos fenólicos com duas bandas entre 220-346nm. Na mesma amostra foram encontrados 4 picos com espectros contendo uma única banda.

Os extratos etanólicos analisados apresentaram diversos outros picos que não foram identificados; contudo, boa parte das bandas tem características de compostos fenólicos.

As cumarinas podem apresentar de duas a três bandas, sendo uma entre 200 e 300nm e outra acima de 300nm, para as que apresentam duas bandas, e mais uma entre 200-300 nm, para as que apresentam três bandas (AMARAL, VIEIRA, *et al.*, 2009). Dentre os picos analisados apenas o detectado no tempo de 32.0 minutos mostrou possuir três $\lambda_{\text{máx}}$ de absorção. Estas análises mostram a riqueza destes ativos na extração etanólica.

As substâncias aqui identificadas possuem espectro característico, ou seja, uma identidade própria, facilitando sua identificação. Para os flavonoides, o espectro de absorção no ultravioleta é determinado pelo núcleo comum da benzopirona e substituintes, sendo que o incremento de hidroxilas a este núcleo permite aumento do efeito batocrômico, conseqüentemente, os espectros deslocam-se no sentido dos maiores comprimentos de onda. Estes compostos em sua maioria possuem dois máximos de absorção, a segunda entre 240-285 nm e a primeira 300-400 nm (SIMÕES, 2010).

De acordo com o MAPA, os extratos alcoólicos de própolis devem apresentar bandas características entre 200 e 400nm devido à presença dos compostos fenólicos. Apesar deste produto (geoprópolis) das abelhas sem ferrão brasileiras não possuírem legislação específica todas as amostras analisadas apresentaram características adequadas a legislação para a própolis da espécie *Apis mellifera*.

Propriedades antimicrobianas já foram atribuídas principalmente a flavonoides. Estes flavonoides, além de já se mostrarem eficazes como coadjuvante anti-inflamatório, potencializando este efeito quando administrado concomitantemente com outros fármacos, também apresentaram ação antibacteriana, principalmente contra bactérias gram-positivas, além de seu efeito antifúngico (CUSHNIE, 2005).

Foi identificado no tempo de retenção 0.91min o ativo ácido gálico este representou 1,47% dentre as substâncias detectadas. O ácido gálico apareceu nos extratos etanólicos das 10 colônias e em boa parte das partições químicas com uma maior absorvância na extração etanólica, podendo sugerir uma melhor afinidade do solvente na obtenção desta substância, seu espectro pode ser visualizado na Figura 31.

O ácido gálico e seus derivados apresentam propriedades antioxidantes, antimicrobiana e propriedades antimutagênicas. O metabolito ácido gálico deriva da via do ácido chiquimíco, um intermediário do metabolismo secundário, e é um componente de taninos hidrolisáveis em plantas. Na literatura, pode-se encontrar relatos da utilização do ácido gálico no tratamento da microalbuminúria e seletiva citotoxicidade contra uma variedade de tumores celulares (BARBOSA, 2010).

Kim (2007) mostrou que o ácido gálico tem duas funções como antimelanogênico e agente antioxidante, propondo que estas duas funções fazem do ácido gálico um composto eficiente para a saúde da pele.

Este achado corrobora com as pesquisas de outros autores como: Torres (2018) que também identificou o ácido gálico em amostras da geoprópolis da *Melipona q. quadrifasciata* provenientes de Santa Catarina-SC, Brasil. Batista e col. (2016) identificou o ácido gálico em amostras da geoprópolis da *Melipona fasciculata* oriundas do Estado do Maranhão- MA, Brasil. Ainda Bankova et al. (2005) demonstraram a presença de ácido gálico na geoprópolis da abelha *Melipona compressipes* coletadas no estado do Piauí, Brasil. Segundo Velikova (VELIKOVA, BANKOVA, et al., 2000), o ácido gálico é um dos principais compostos encontrados em amostras de própolis de abelhas sem ferrão coletadas nos Estados brasileiros de Pernambuco, Paraná e São Paulo.

Um estudo preliminar indicou a presença de terpenos e ácido gálico na geoprópolis da *Melipona mondury* provenientes da cidade de Nova Ibiá- Bahia, Brasil. Segundo o autor os resultados indicaram um potencial terapêutico desta geoprópolis contra agentes inflamatórios, oxidativos, doenças infecciosas e neoplásicas (SANTOS, QEIROZ, et al., 2017).

A presença do ácido gálico também foi descrita em amostras de própolis da *Heterotrigona itama* da Malásia (ZHAO, YU, *et al.*, 2017). E em amostras da geoprópolis da *Melipona fasciculata* oriundas do Maranhão, a esta o autor relata que a propriedade antioxidante da geoprópolis pode ser atribuída aos altos teores de fenólicos totais, ácido gálico e elágico contidos (BATISTA, ABREU, *et al.*, 2016).

Outro importante flavonoide encontrado no extrato etanólico da geoprópolis da *Melipona quadrifasciata anthidioides* deste estudo foi a naringenina. que apareceu no tempo de retenção (Tr) de 16,92, representando uma média de 3,48% dentre as outras substâncias separadas nos diferentes extratos (APENDICE XI).

A presença destes flavonoides é abundante em espécies *Citrus*, sendo seu principal constituinte bioativo (ALVES, 2007). Uma espécie comum na região onde a geoprópolis foi coletada. Esta observação pode fornecer uma pista sobre a fonte de matéria-prima para a produção de geoprópolis pela *Melipona quadrifasciata anthidioides*.

A naringenina é um polifenol da classe dos flavonoides, subclasse flavanona, encontrada principalmente em frutas cítricas. Também apresenta efeitos benéficos à saúde, tais como antioxidante e neuroprotetor, demonstrando atravessar a barreira hematoencefálica, reduzindo o estresse oxidativo e a inflamação através da inibição da ativação do fator nuclear κ B (NF- κ B, do inglês nuclear fator κ B) (AUGUST, 2016). A naringenina exibe ação *in vitro* contra *H. pylori*, podendo ser útil no combate à úlcera gástrica (GUPTA, 2011).

Este flavonoide apresenta uma estrutura responsável pelo sequestro de radicais livres, resultando em uma poderosa atividade antioxidante no organismo, A naringenina também já foi localizada como constituinte químico de plantas como a *Citrus paradisi*, onde mostrou atividade gastroprotetora devido ao aumento da expressão da biossíntese de prostaglandinas (ALVES, 2007), além de inibir a atividade da enzima ciclooxigenase 1, enzimas estas que estão ligadas diretamente relacionadas aos processos inflamatórios (ZENG e H. J., 2006). De acordo com Mirzoeva e Calder (1996) a atividade anti-inflamatória da própolis é

resultante da supressão da síntese de prostaglandinas e de leucotrienos pelos macrófagos.

Santos et. al (2017), identificaram o flavonoide naringenina em extratos da *Melipona quadrifasciata anthidioides* que tem sido descrito como modulador da atividade das enzimas superóxido dismutase, glutathione peroxidase e catalase, além de proteger a membrana celular contra o processo de peroxidação lipídica, inibindo a produção de malondialdeído e aumentando a conteúdo de grupos tiol-SH. O trabalho de Cisilotto et al. (2017), também identificou naringenina em geoprópolis da *Melipona quadrifasciata anthidioides* oriundos de Santa Catarina – SC. Os resultados deste autor demonstraram um potencial mecanismo de citotoxicidade em melanomacélulas.

O estudo de Silva (2013), isolou naringenina e naringenina- 4'-O- β -glicopiranosídeo, em amostras da geoprópolis das espécies *M. interrupta* e *M. seminigra* oriundos da região amazônica. O autor destaca que os extratos dessas espécies apresentaram atividades antioxidantes importantes para a manutenção e prevenção de doenças. Souza, (2013) investigando o extrato da geopropolis preparada pela abelha *Melipona subnitida*, isolou a 7-O-metil-naringenina.

A naringenina ainda foi identificada através do UPLC-DAD-QTOF-MSE, no extrato etanólico da geoprópolis da abelha *Melipona subnitida* da Paraíba (JÚNIOR, CABRERA, et al., 2019).

A naringenina também é descrita em amostras de própolis de *Apis mellifera* da Alemanha (PIETTA, GARDANA e PIETTA, 2002) e em própolis vermelha brasileira (INUI, HATANO, et al., 2014). Este flavonoide ainda foi confirmado em análises por CLAE com os extratos aquoso, em etanol, em acetona e em clorofórmio de própolis oriunda de outros países como China e Itália (GUO, CHEN, et al., 2011) (PAPOTTII, BERTELII, et al., 2012). Também foram relatadas a identificação da naringenina em análises por CG-MS em amostras de própolis do Peru (SEVEN, YILMAZ, et al., 2012).

Segundo Cushnie e Lamb (2005), durante séculos preparações contendo flavonoides e os constituintes fisiologicamente ativos foram usados por médicos e

curandeiros na tentativa de minimizar diversas doenças humanas. Por exemplo, as propriedades curativas da própolis foram todas descritas no antigo testamento, sendo este bálsamo prescrito para o tratamento de feridas e úlceras por Hipócrates na Grécia Antiga (FLAMBÓ, 2013).

Em um estudo com um spray à base de lipossomas de naringenina a 1%, foi observado um efeito positivo sobre a contração de feridas cutâneas abertas de ratos; assim fica evidente o potencial dessa substância na utilização em cicatrização de feridas da pele. (ARAGÃO e ET AL., 2015).

Outros flavonoides como o kampferol e o kampferide foram encontrados na geoprópolis desta pesquisa e identificados nos tempos de retenção de 25,91min, 31,91min, representando (6,42%) e (6,48%) respectivamente entre as substâncias detectadas (APÊNDICE B).

Souza (2013) relata a identificação de kampferol em amostras da geoprópolis da abelha *Melipona subnitida* oriunda da Paraíba- PB. O kampferol ainda foi relatado em amostras da própolis de outras espécies de abelha sem ferrão como na pesquisa de Ferreira (2017) e Zhao (2017) que identificaram esta substância no subproduto das espécies *Scaptotrigona postica* do Rio Grande do Norte-RN e na espécie *Heterotrigona itama* oriunda da Malásia, respectivamente.

O kampferol também já foi identificado em amostras de própolis da abelha *Apis mellifera* brasileira principalmente dos estados de Goiás (GO), Paraná (PR), São Paulo (SP) e Mato Grosso do Sul (MS) (PARK., K, *et al.*, 1998).

Kumazawa, Hamasaka e Nakayama (2004) em um estudo mais amplo identificou o kampferol na própolis da *Apis mellifera* de diversos países (Argentina, Brasil, Uruguai, Chile, China, Hungria, Tailândia, Ucrânia, Urbesquistão, Austrália, Bulgária, Nova Zelândia, África do Sul e EUA). Assim como POPOVA (2014) que identificou o kampferol na própolis de *Apis mellifera* originária da Bulgária.

O kampferol - flavonol amplamente distribuído pelo reino vegetal - apresenta significativa ação anti-inflamatória, que pode ser atribuída à inibição das enzimas fosfolipase A₂ (PLA₂), lipo-oxigenase, ciclo-oxigenase e inibição da

produção de óxido nítrico, através da modulação da enzima iNOS (COUTINHO, MUZITANO e COSTA, 2009).

Segundo estudo, kampferol induz a apoptose através da ativação do ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (TRAIL) em células SW480 do câncer humano. Atua também inibindo a proteína ribossômica S6quinase (RSK2) que é ativada em estado de estresse. Além disso, esta substância é capaz de suprimir a atividade da Src quinase e inibe a COX-2. O kampferol mostrou propriedade preventiva efetiva contra o câncer de pele (SILVA e AL, 2018).

O tratamento com kampferol provoca uma regulação negativa da proliferação no cancro da próstata humana através da supressão do antígeno nuclear de células proliferativas (PCNA) e da molécula de adesão celular vascular (VCAM-1) (SILVA e AL, 2018).

Segundo (FLAMBÓ, 2013) dentre 38 flavonoides testados o kampferol se mostrou ativo contra *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina (MRSA), característica dos flavonoides polihidroxilados estudados. Além de serem capazes de inibir a formação de biofilmes de *Streptococcus mutans*, *Aeromonas hydrophila* e *Escherichia coli*.

Em um estudo comparativo entre dois tipos de própolis Chilena, encontraram kampferol em ambas as amostras e suas atividades anti-inflamatórias tópicas foram atribuídas a diferença nos perfis fenólicos. (BARRA, CASTRO, *et al.*, 2015).

Segundo Kumazawa (2004), o kampferol e fenil cafetato isolados de própolis apresentaram alta atividade antioxidante.

Recentes estudos mostraram que o extrato bruto da própolis apresentou efeitos anticancerígenos em células de câncer de pulmão humano e é antimelanogênico na linha celular de melanoma (BONAMIGO e AL., 2017).

Nath *et. al* (2013) atestaram pela primeira vez a capacidade do kaempferide isolado de induzir apoptose em células de câncer cervical sem contudo, observar toxicidade em estudos *in vivo* e *in vitro*.

O cromatograma da fração diclorometânica (Figura 32) apresentou 19 picos; destes apenas 3 picos foram identificados por comparação com os padrões: naringenina, kampferol e kampferide.

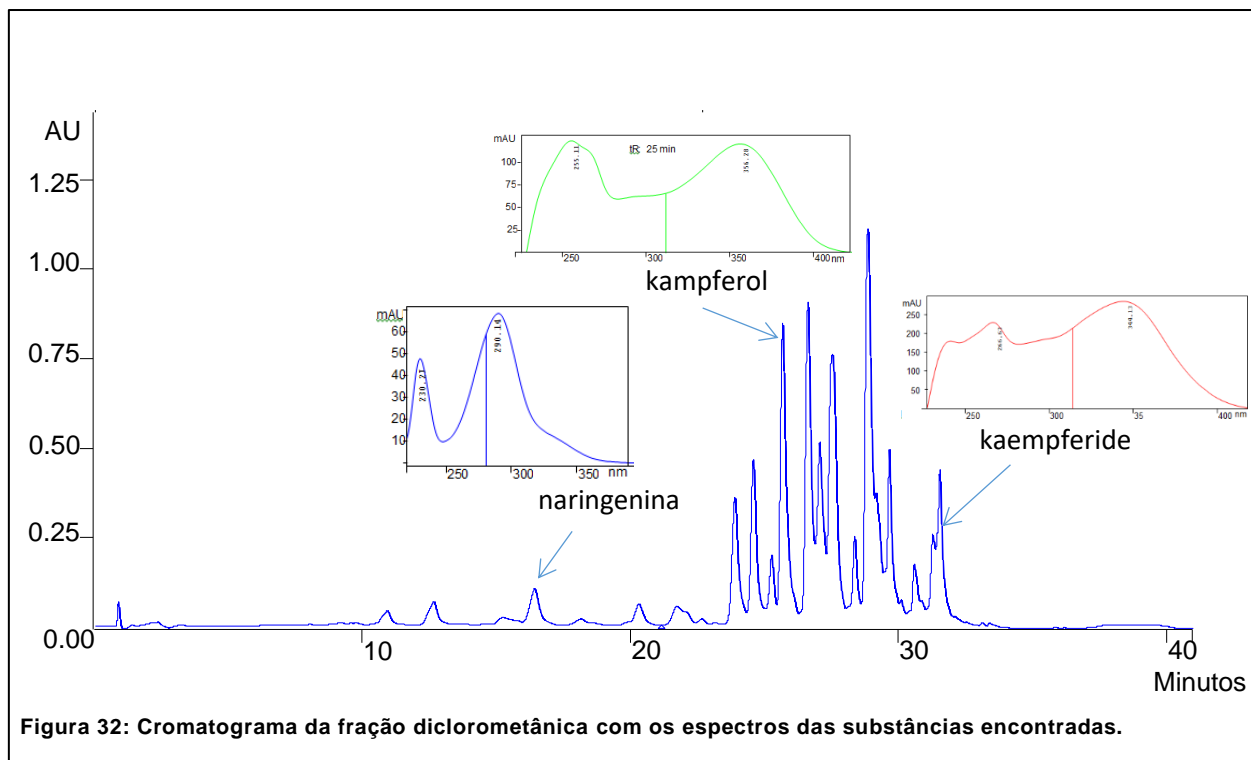


Figura 32: Cromatograma da fração diclorometânica com os espectros das substâncias encontradas.

A fração hexânica apresentou 17 picos em seu cromatograma (Figura 33), dos quais, apenas o kaempferide foi identificado.

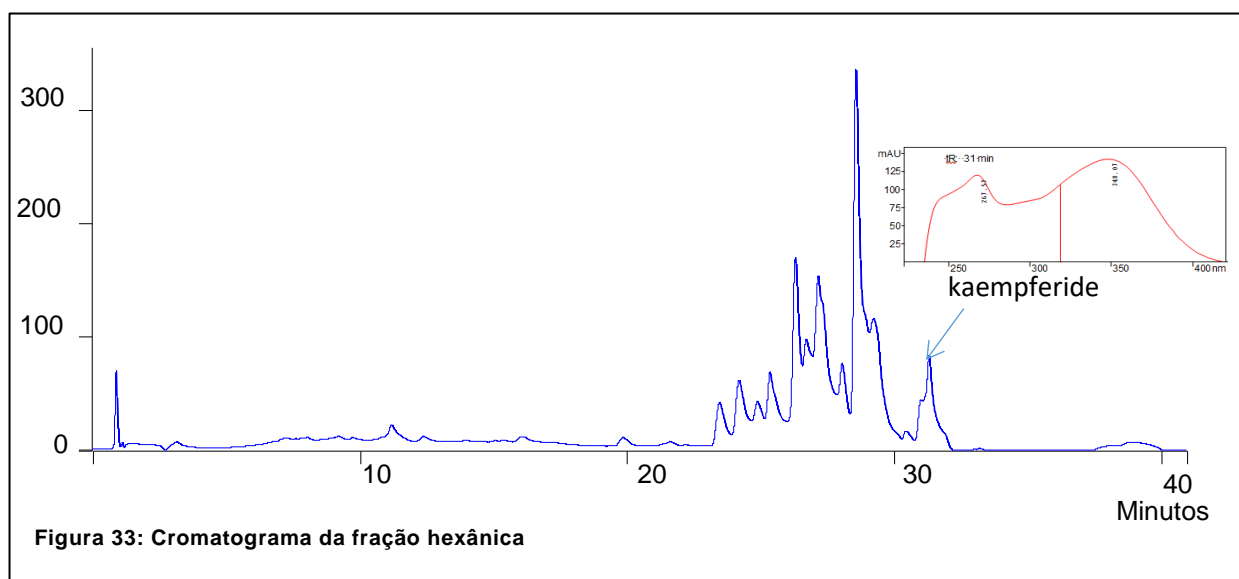
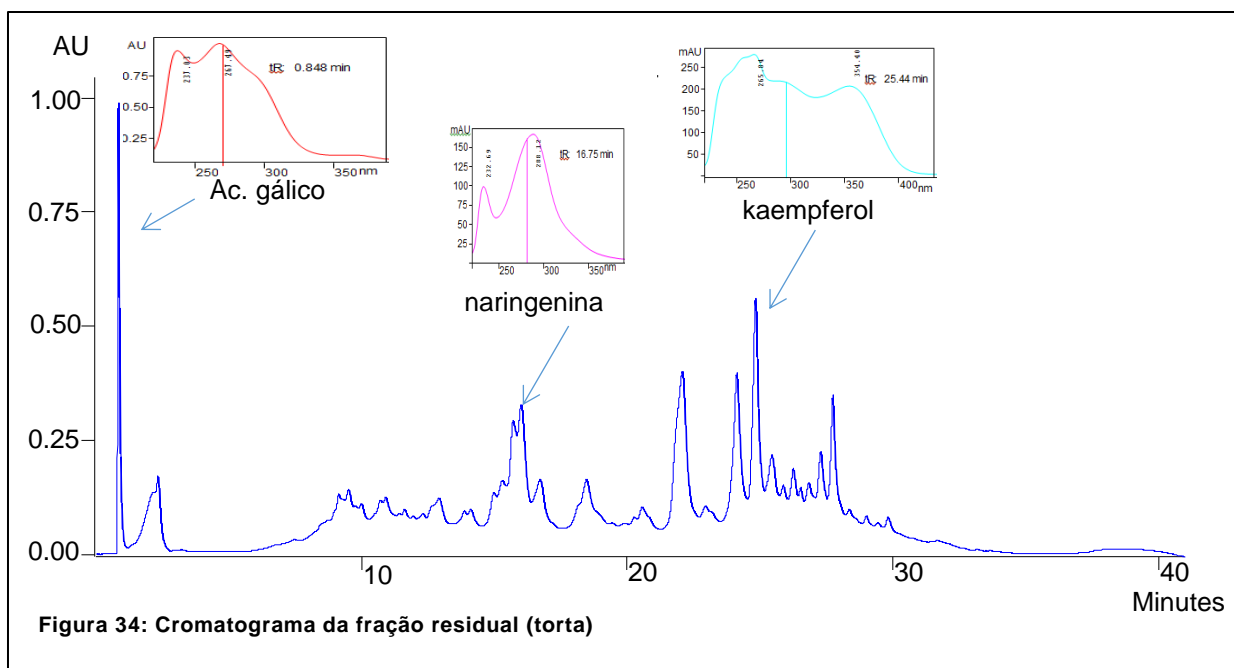


Figura 33: Cromatograma da fração hexânica

O resíduo “torta” apresentou 18 picos com identificação de 3 substâncias, ácido gálico, naringenina e kaempferol.



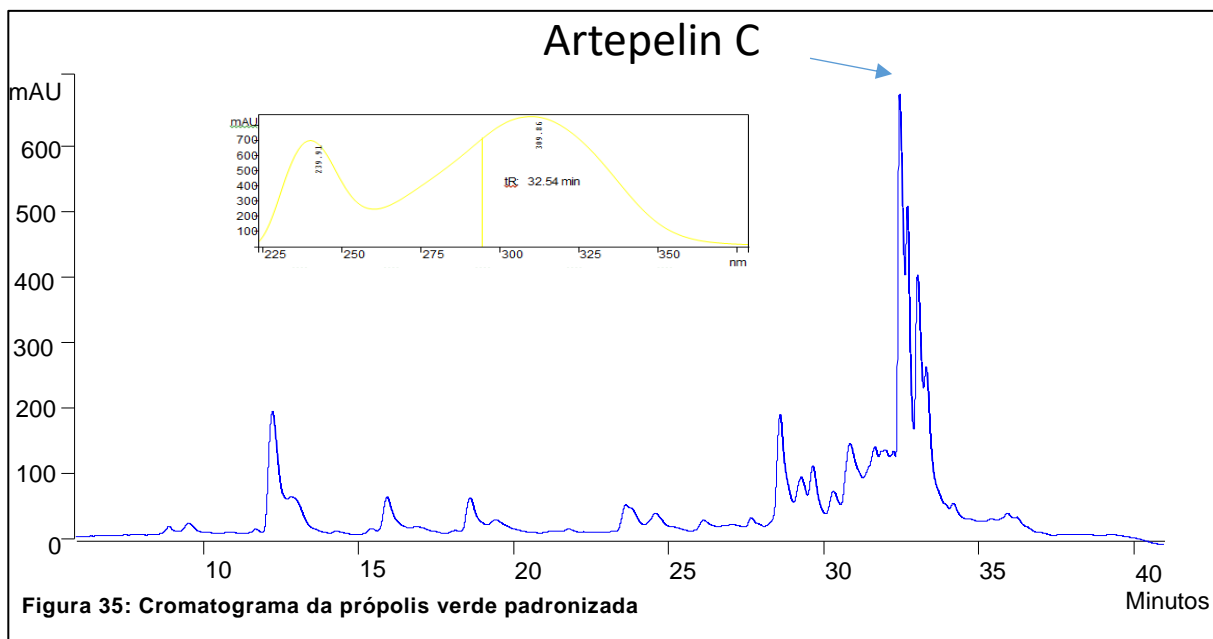
Uma amostra comercial do extrato etanólico da própolis verde, padronizado em 25% (m/v) e registrado no Serviço de Inspeção Federal (S.I.F) brasileiro, também foi analisada com a intenção de comparar com o perfil químico da geoprópolis da abelha *Melipona quadrifasciata anthidioides*.

No cromatograma da amostra do extrato da própolis verde comercial, (Figura 34) foi identificado o artepelim-C comprovando seu perfil químico diferente da geoprópolis desta pesquisa.

O artepelim C foi isolado e identificado por Aga et al em 1994 sendo um ácido fenólico, construído a partir de anéis únicos e possui dois grupos pernil, isolado como constituinte principais (>5%) a partir da própolis brasileira. Já foi confirmado que este ácido fenólico possui atividades biológicas importantes como, por exemplo antitumoral, anticancerígeno (MIDORIKAWA, BANSKOTA, *et al.*, 2001).

A própolis verde é produzida em áreas da região sudeste do Brasil, cuja flora principal é rica em espécies de *Bacharis dracunculifolia*, A sua quantificação

tem se tornado um fator importante como indicador da qualidade da própolis brasileira comercializada internacionalmente (MATSUDA, 2006).



Diante destas informações fica evidente a importância de estudos do perfil químico da geoprópolis de meliponas da região semiárida do Nordeste brasileiro, com o objetivo de identificar algum marcador específico para este tipo de geoprópolis e assim podermos estabelecer padrões de identidade e qualidade deste produto.

De acordo com (KUJUMGIEV, 1999) Estudos ainda revelaram a presença de ácidos aromáticos e di e triterpenos na geoprópolis produzida pela *Melipona quadrifasciata anthidioides* e mostrou sua ação antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*.

Foi descrito potencial antimicrobiano ao geoprópolis de *Melipona quadrifasciata anthidioides* atribuídos a inibição de *S. aureus* pela à presença do ácido kaurenóico (VELIKOVA. e M., 2000).

A presença de vários outros compostos na geoprópolis dessa subespécie de abelha foi recentemente divulgada como estigmasterol, taraxasterol, ácido

vanílico, ácido cafeico, quercetina, luteolina e apigenina, e demonstraram sua ação antioxidante e citotóxica (BONAMIGO, 2017).

Em relação à geoprópolis dessa subespécie (BANKOVA. e V., 1998) investigaram sua composição química, demonstrando a presença de compostos como ácido palmítico, ácido oléico, ácido benzóico, ácido cinâmico, vanilina e coniferaldeído.

Os compostos identificados neste estudo (ácido gálico, naringenina, kampferol e kampferide) também foram relatados por diversos autores em espécies vegetais catalogadas no CEARIS e em seu entorno (500 a 2km) (Tabela 20).

Estas informações do perfil químico da geoprópolis aqui pesquisada podem fornecer uma pista de quais espécies químicas foram visitadas por estas abelhas no processamento deste produto.

4.6 Atividade antioxidante, fenólicos totais e flavonoides

A tabela a seguir apresenta os resultados dos flavonoides totais, Potencial antioxidante e fenólicos totais do Extrato Etanólico da Geoprópolis (EEGP).

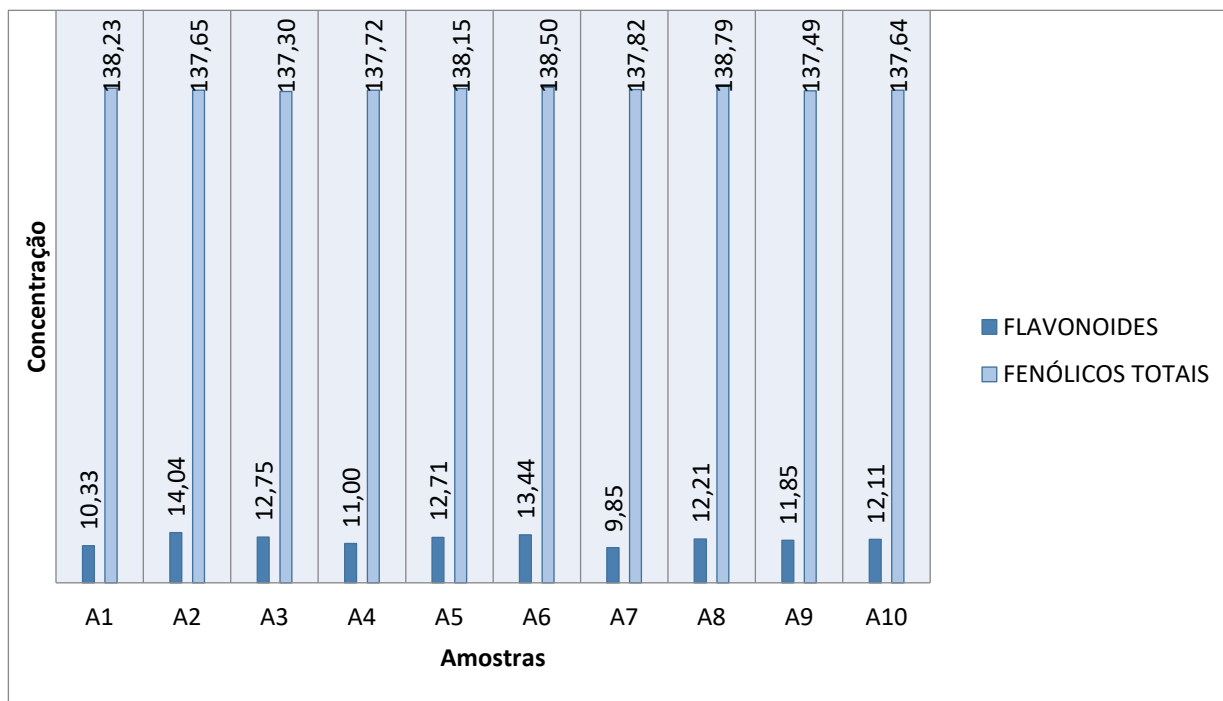
Tabela 21: Resultados dos flavonoides, potencial antioxidante e fenólicos totais encontrados nos EEGP.

	FLAVONOIDES (média mg em eq g ⁻¹ quercetina /100g do extrato)	POTENCIAL ANTIOXIDANTE %	FENÓLICOS TOTAIS (média mg em eq g ⁻¹ ac gálico /100g)
AM 1	10,33±0,03	95,75	138,23±0,22
AM 2	14,04±0,04	95,75	137,65±0,20
AM 3	12,75±0,05	95,10	137,30±0,15
AM 4	11,00±0,08	95,75	137,72±0,11
AM 5	12,71±0,07	96,51	138,15±0,19
AM 6	13,44±0,03	95,97	138,50±0,17
AM 7	9,85±0,03	96,95	137,82±0,21
AM 8	12,21±0,03	96,08	138,79±0,13
AM 9	11,85±0,05	96,62	137,49±0,07
AM 10	12,11±0,03	95,86	137,64±0,04

Fonte: (autor)

Comparando-se os resultados de flavonoides e fenólicos totais do EEGP (gráfico 15) observou-se que os resultados estão coerentes com dados de outros autores pesquisados na tabela 22.

Gráfico 15: Flavonoides, e fenólicos totais encontrados no extrato etanólico (EEGP).



Os compostos fenólicos totais também foram quantificados nas frações diclorometânica, hexânica e no resíduo (torta), (gráfico 16), em menor quantidade na partição hexânica, que pode ser corroborada pela menor quantidade de picos cromatográficos apresentados na (Figura 32).

Gráfico 16: Fenólicos totais encontrados nas frações diclorometânica, hexânica e resíduo (torta).

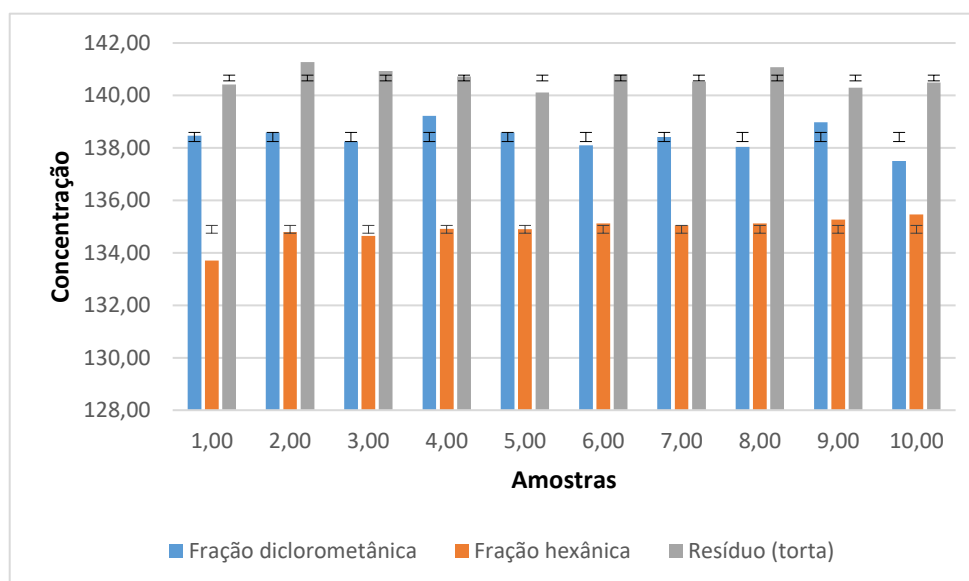


Tabela 22: Comparação de atividade antioxidante, fenólicos totais e flavonoides em diferentes própolis

COMPOSTOS IDENTIFICADOS	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	FENOLICOS TOTAIS	FLAVONOIDES	ESPÉCIE	REGIÃO	REFERÊNCIA
Ácido gálico, naringenina, Kampferide e kampferol	65,10 - 96,62%	137,30 - 138,79 mg em eq g-1 ác gálico /100g	9,85 - 14,04 mg em eq g-1 de quercetina/100g	<i>M. q. anthidioides</i>	BA	AUTOR
Naringenina, Aromadendrina, Naringenina-4'-O-b-Glicopiranosídeo, Miricetina-3-O-b-Glicopiranosídeo, 5,7-dihydroxy-6- (3-methyl-2-butenyl)-8-(4-cinnamoyl-3-methyl-1-oxobutyl)-4-propyl-coumarin, 5,7-dihydroxy-6-(4-cinnamoyl-3-methyl-1-oxobutyl)-4- phenylcoumarin, hydroxymammeigin, cinnamoyloxy-mammeisin, ent-nemorosone	10,0±0,5 a 493,3±1,9 µg mL ⁻¹	431,0± 2,9 a 5199,4±0,5 mg em eq g-1 ác gálico /100g	*	<i>M. interrupta</i>	AM	SILVA,2013
ácido gálico(11.23), HHDP-galloylglucosec 19:26, HHDP-glucosec 25:60, di-HHDP-glucose 27:16, trigalloyl glucosec 30:56, HHDP-digalloylglucose isomer 30:98, valoneic acid dilacton 35:62, trisgalloyl-HHDP-glucose isomer 39:25, di-HHDP-galloylglucose 45:08, trigalloyl-HHDP-glucose 51:39, ellagic acid 69:88	3,75-17,86µg mL ⁻¹	6,32-57,90%	*	<i>Melipona fasciculata</i>	MA	DUTRA,2014
Coumaric acid(8.80), ácido felúrico(14.01), Kanferide(57.85), Artepilin C(88.50)	3,75-17,86µg mL ⁻¹	6,32-57,90%	*	<i>Apis mellifera</i>	MG	CABRAL,2012
Ácido gálico e terpenos	6.91 ± 017 µg mL ⁻¹ / 27.99%	144.4 ± 0.01 µg GAE/mg	*	<i>Melipona mondury / geopropolis</i>	BA	SANTOS,2017
6-O-p-coumaroyl-D-galactopyranose, 6-O-cinnamoyl-1-O-p-coumaroyl-β-D-glucopyranose, 7-O-methyl naringenin, 7-O-methylaromadendrin, 7,4-di-O-methyl aromadendrin, 4-O-methyl kaempferol, 3-O-methyl quercetin, 5-O-methyl aromadendrin, and 5-O-methyl kaempferol	27,0±0,4 µg mL ⁻¹ (35,7%)	63,9±8,6 mg em eq g-1 ác gálico /100g	*	<i>Melipona subnitida</i>	PB	SOUZA,2013
ácido gálico(2,68), vanilina(7,67), ácido -p-coumarico(12,73), quercetina(24,45)	IC50=241.8 mg/mL / IC50=2433.0 mg/mL.	*	*	<i>Melipona quadrifasciata quadrifasciata / Tetragonista angustula</i>	SC	TORRES,2018
ácido gálico(2,69), ácido caféico(6,11), ácido p-cumárico(11,21), ácido felurico(13,44), ácido cinâmico(28,88), quercetina(31,89), naringenina(32,19), kaempferol(33,27), pinocembrina(35,65), crisina(58,78), acacetina(60,48), galangina(62,03), artepilim- C (81,72)						ASSIMOS,2014

Propolins, flavanonas	IC50µg/mL(18,8±0,2 - 25,2±0,2)	(49,9-69,2%) ou 75,2±2,3 - 279,6±9,0) mg em eq g-1 ác gálico /100g	56-83,8%	<i>Apis mellifera</i>	Taiwan	POPOVA,2010
Ácido caféico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, kaempferol, pinocembrina, crisina, galangina, pinostrobrina, cafeato de feniletila, cafeato de benzila e cafeato de isopentila	*	19,0 -27,0mg/mL	4,8-15,0mg/mL	<i>Apis mellifera</i>	Bulgarian	POPOVA,2004
Ácido caféico, ácido p-cumárico, quercetina, apigenina, kaempferol, pinobanksina, crisina, pinocembrina, galangina, tectocrisina, artepillin C, ácido, 3,4-dimetoxicinâmico.	20%-70%	(31.2±0.7 a 299±0.5) mg em eq g-1 ác gálico /100g	(2,5±0,8 a 176±01,7)	<i>Apis mellifera</i>	Argentina, Brasil, Uruguai, Chile, China, Hungria, Thailandia, Ucrania, Urbesquistão, Australia, Bulgária, Nova Zelandia, Africa do Sul e EUA.	KUMAZAWA, 2004.
Ácido caféico, p-e mcumárico, quercetina(16.67), kaempferol(33.53), naringenina(23.06), crisina(39.27), galangina(42.80) e pinocembrina(41.87)	*	*	*	<i>Apis mellifera</i>	Germany	PIETTA, P. G, 2002.
Quercetina, kaempferol, apigenina, isorhamnetina, rhamnetina, pinocembrina, sakuranetina, crisina, acacetina, galangina, kaempferide, e tectocrisina	*	*	*	<i>Apis mellifera</i>	PR, SP, GO,MS	PARK et al, 1998.
ácido p-cumárico; quercetina; pinocembrina; crisina; Artepillin C.	*	43,10±2,88mg/g ou (4,31 ±0,28)%	3,75 ±0,41mg/g ou (0,37±0,04)%	<i>Apis mellifera</i>	SC	TOMAZZOLI,2015
4-phenyl-coumarina, 4-propyl-coumarina, Mammein, Mammeigin, benzophenona.	*	*	*	<i>M. scutellaris</i>	BA	CUNHA,2016
aromadendrina, naringenina, metil aromadendrina, metil naringenina, galloyl, cinnamoyl e coumaroyl	IC50µg/mL (10,32±0,5 - 18,3±2,8) (95±0,5-98±0,1)%	121±0,6 mg GAE/g	19,9±1,1 mg(QE)/g	<i>Melipona orbignyi</i>	MS	SANTOS HELDER, 2017
quercetina(35.2), kaempferol (41.00), Dimethoxy-dihydroxy chalcone(56,5), Dihydroxy-trimethoxy flavone(59.9)	EC50 (74.1 ± 0.5 µg mL-1)	111.5 ± 5.4 g kg-1)	98.5 ± 8.6 g kg-1	<i>Scaptotrigona postica</i>	RN	FERREIRA,2017
ácido gálico (2.2), ácido caféico (3.3), ácidocafeoilquinico(3.9), ácido vanílico (5.5), cafeína(9.3), ácido siringico (16.5), Pyrogallol (25.2), ácido benzóico(31.8), vitexina(33,1) acetilleugenol(34.9) kaempferol (39,7), lapachol(42.4), (E)-cycloart-24-ene-26-ol-3-	*	*	*	<i>Heterotrigona itama</i>	Malásia	ZHAO,2017

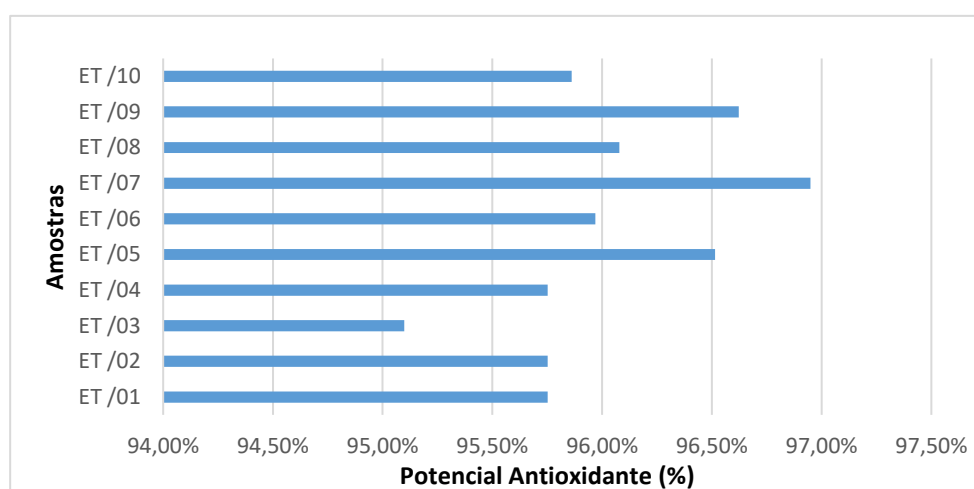
one and 20-hydroxy-24-dammaren-3-one						
(3S)-vestitol; (3S)-neovestitol; isoliquiritigenin; medicarpin; dihydroxyphenyl-3- methyl-6-methoxybenzofuran; liquiritigenin; naringenina ; (2S)-7-hydroxyflavanone; biochain A; daidzein; formononetin e retusapurpurin A.	*	*	*	<i>propolis vermelha / D. ecastophyllum plant resin,</i>	BR	SAORI INUI,2014
cicloartano, ursano , oleanano, ácido protocatecuico, ácido gálico , elágico, lanosterol, arabitol, sorbitol, xylitol, inositol, frutose, galactose, ribose,xylose,ácido esteárico	4.24 - 44.44 µg mL ⁻¹ IC50 µg mL	126.6 - 847.5 mg GAE g ⁻¹	*	<i>Melipona fasciculata</i>	MA	BATISTA ,2016
Catechin-3-O-gallate (3.9), Caffeoyl glucoside(5.6), 7-Methoxy-5-hydroxy-8-C-flavone rhamnoside(6.5), Apigenina(28.5) , acetina (16.5), luteolina(31.0), vicenina-2 (27.0),	*	*	*	<i>Scaptotrigona postica</i>	MA	COELHO,2015
stigmaterol, taraxasterol, ácido vanílico (7.95), ácido-p-cumárico, ácido caféico, benzóico, felúrico, cinâmico,quercetina, luteolina e apigenina .	DPPH (%) 14,91±1,73 - 97,47±0,03)	*	*	<i>Scaptotrigona depilis / Melipona quadrifasciata anthidioides</i>	MS	BONAMIGO.2017
Lelobanonoline (4.06) , 2-[6-(2-hydroxy-propyl)-1-methyl-[2]piperidyl]-1-phenylethanone (4.14) ,alkaloid (4.52) ,Norlobelanidine (4.98) ,Norlobeline(5.21), alkaloid (5.35) , Lobelanidine (5.54) Fat acid (13.53), Triterpene (14.39) , Fat acid 14.97), Vicenin-2 (2.92)	*	*	*	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	SC	CISILOTTO,2018
Vicenin-1 or Vicenin-3 (3.14), Vicenin-1 or Vicenin-3(3.39) alkaloid (4.53)						
7-O-methyl aromadendrin (6.45), 5-hydroxy-4 ,7-dimethoxyflavone (7.03) Abieta-8,11,13,15-tetraen-18-oic acid (8.44), Abietic acid (9.15), 7-hydroxydehydroabietic acid (9.75) , 7-oxidehydroabietic acid(10.06) , Mepuberin (11.31)						
2- hydroxynaringenin (4.46),4-O-(6''-O-p-coumaroyl-dglucopyranosyl)-p-coumaric acid (5.34), Narigenin (5.89),Pinusenocarp (6.07), 7-O-methyl aromadendrin (6.40), -O-cinnamoyl-1-O-p-coumaroyl-d-glucopyranoside(6.77) Nemorosin or Inumakiol D 7.17 C20H28O4 331.1891 -5.4 313.1789, 289.1468, 255.1392 polyphenol 8.05	*	*	*	<i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i>	SC	CISILOTTO,2018
galloyl, ellagic acid, acyl-(cinnamoyl/coumaroyl)-hexosides, acyl-(cinnamoyl/coumaroyl)-galloyl-hexosides e (aglycones and acylated-O-glycosides).	*	*	*	<i>Melipona subnitida</i>	PB	SOUZA et al,2018

Palmitic acid, Oleic acid, Stearic acid, Arachidic acid, Behenic acid, Lignoceric acid, Quinic acid, Gallic acid , Ellagic acid, Protocatechuic acid, Amirin, Lupenona, Oleanolic acid, Campesterol, Stigmasterol, Sitosterol, Fructose, Glucose, Mannose, Xylose, Glycerol, Xylitol, Inositol.	*	*	*	<i>Melipona fasciculata</i>	MA	DUTRA, 2019
<i>aromadendrina (naringenina, Coumaroylgalloyl-hexoside, Digalloylcoumaroylhexoside, Cinnamoylgalloyl-hexoside, Digalloylcinnamoylhexoside, Dicoumaroylhexoside, Dicoumaroylgalloyl-hexoside</i>	IC50 28.9 ± 1.3 µg/mL,	118.7 ± 2.8mg GAE/g	25.4 ± 2.8mg QE/g	<i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i>	MS	SANTOS, 2017
*	49,93-94,31%	(5,67±0,39% a 9,40±0, 28%)	(10,05mg e 22,00mg/100g)	<i>Plebeia aff. flavocincta</i>	RN	SILVA, 2016
*	22 seg, con media de 3 a 5 seg.	*	(0,3%, 0,55 a 0,97% e 0,23%)	<i>T. angustula, Nannotrigona sp. M. compressipes</i>	Venezuela	MANRIQUE, 2008
	21.7%	14.8 mg GA/g (1.48%)	0.32%.	<i>Apis mellifera</i>	BA	CABRAL, 2012
(4.03)Tetrahydroxy-flavanone, (4.20) Tetrahydroxy-flavone, (4.40) O-methyl-quercetina, (4.77) Myricetindimethyl-ether, (4.85) Naringenina , (4.93) Trihydroxy-flavone, (5.08) Tetrahydroxy-flavone, (5.48) Trihydroxy-methoxy-flavone, (5.15) Isorhamnetina, (5.22) Trihydroxy-methoxy-flavone, (5.54) Tetrahydroxy-methoxy-flavone, (5.65), Quercetin dimethylether (5.70), Quercetindimethylether, (5.87) Hydroxy-methoxy-chalcone, Trihydroxy-methoxy-flavanone, (6.11) Hydroxy-methoxy-flavanone, (6.28) Dihydroxy-dimethoxy-flavone, (6.48) Tetrahydroxy-methoxy-flavone, (6.64) Pentahydroxy-flavone, (6.77) Dihydroxy-trimethoxy-flavone, (6.98) O-methyl naringenin(sakuranetin), (7.15) Dihydroxymethoxyflavone, (7.37) Dihydroxy-dimethoxy-flavone, (7.64), Dihydroxy-dimethoxy-flavone (7.87), Dihydroxy-trimethoxy-flavone, (7.97) dihydroxy-methoxy-chalcon	*	*	*	<i>Melipona subnitida</i>	PB	JUNIOR, 2019
	*	*	0,24%	<i>M. quadrifasciata</i>	Ribeirão Preto-SP	MANRIQUE, 2008
*	0,40-5,23 grama de amostra por grama de DPPH.	*	*	<i>Melipona flavolineata, Melipona fasciculata, Melipona melanoventer</i>	AM	OLIVEIRA, 2015

	<p>53.9%</p> <p>6.91 ± 0.17 / 27.99%</p> <p>10,0±0,5 a</p> <p>493,3±1,9</p> <p>27,0±0,4 (35,7%)</p> <p>IC50=241.8 mg/mL / 2433.0 mg/mL.</p>	<p>169.6 mg GA/g (16.96%)</p> <p>144.4 ± 0.01 µg GAE/mg</p> <p>431,0± 2,9 a</p> <p>5199,4±0,5</p> <p>63,9±8,6</p>	6.15%.	<p><i>Frieseomelitta flavicornis,</i> <i>Frieseomelitta longipes,</i> <i>Scaptotrigona sp.</i></p> <p><i>Apis mellifera</i></p> <p><i>Melipona mondury</i></p> <p><i>Melipona subnitida</i> <i>Melipona quadrifasciata</i> / <i>Tetragonisca angustula</i></p>	<p>MG</p> <p>BA</p> <p>AM</p> <p>PB</p> <p>SC</p>	<p>CABRAL,2012</p> <p>SANTOS,2017</p> <p>SILVA,2013</p> <p>SOUZA,2013</p> <p>TORRES,2018</p>
--	---	---	--------	--	---	--

De acordo com o gráfico 17, verificou-se que todos os EEGP apresentaram potencial antioxidante. Estes dados corroboram com os autores (SILVA,2013, DUTRA, 2014, SANTOS 2017, SOUZA,2013, TORRES,2018 CUNHA,2016, SANTOS-HELDER, 2017, FERREIRA,2017, BATISTA ,2016, COELHO,2015) que também encontraram atividade antioxidante em espécies de abelhas sem ferrão nativas brasileiras. Os mesmos autores correlacionam a atividade antioxidante do geoprópolis aos compostos fenólicos (flavonoides) presentes nos extratos.

Gráfico 17: Potencial antioxidante: % de captura do radical DPPH no EEGP.



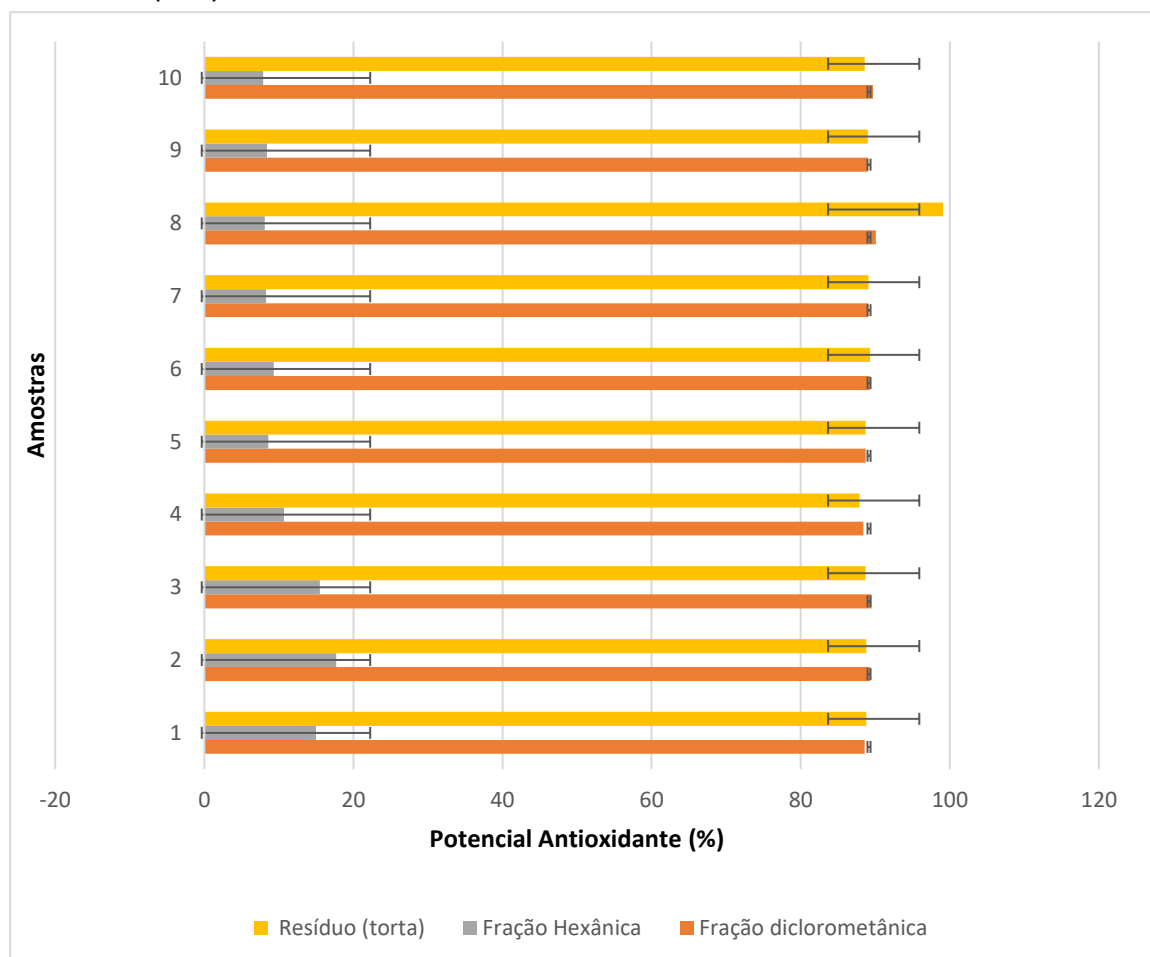
Como no caso do estudo de Souza (2013) que mostrou potencial antioxidante em torno de (35,7%) no extrato etanólico da geoprópolis da *Melipona subnitida* oriunda da Paraíba, com $63,9 \pm 8,6$ mg de fenólicos totais. em eq g-1 ác. gálico (GAE)/100g.

Uma pesquisa quantificou fenólicos totais ($121 \pm 0,6$ mg GAE/100g) e flavonoides ($19,9 \pm 1,1$ mg QE/g) em extrato da geoprópolis da *Melipona orbignyi* do Mato Grosso do Sul-MS. Este extrato apresentou atividade antioxidante variando de (95 -98%) (SANTOS, F e ET.AL., 2017), valores bem próximos dos encontrados nesta pesquisa com a geoprópolis da *Melipona quadrifasciata anthidioides*, originária da Bahia.

Segundo Ferreira (2017), amostras de própolis da espécie sem ferrão *Scaptotrigona postica* (Mandaguari) do Rio Grande do Norte –RN apresentaram

(111,5±5,4 mg/g) de fenólicos totais e (98,5±8,6mg/g) flavonoides. Batista et al., (2016) encontrou fenólicos totais variando de (126,6 -847,5 mg GAE/100g) em extratos da geoprópolis da *Melipona fasciculata* do Maranhão - MA.

Gráfico 18: Potencial antioxidante, % de captura do radical DPPH nas frações diclorometânica, hexânica e no resíduo (torta) do EEGP.



Além disso outro trabalho também quantificou fenólicos totais (118,7±2,8mg GAE/100g) e flavonoides (25,4 ± 2,8mg QE/g) na geoprópolis da abelha *Melipona quadrifasciata anthidioides* do Estado do Mato Grosso do Sul - MS. (SANTOS, QEIROZ, et al., 2017). Estes valores foram próximos aos encontrados nesta pesquisa (138,79 mg GAE/100g) e (14,04 mg QE/g) respectivamente. Ainda Bonamigo et al. (2017) também encontrou atividade antioxidante em extratos da geoprópolis da *Melipona quadrifasciata anthidioides* (97,17%±0,03) e própolis da *Scaptotrigona depilis* (14,91%±1,73) do Estado do MS.

Amostras de própolis da abelha sem ferrão *Plebeia aff. flavocincta* provenientes do Estado do RN apresentaram o teor de fenólicos totais variando de ($5,67 \pm 0,39$ a $9,40 \pm 0,28$ GAE/100g) e de flavonoides ($10,05\text{mg} - 22,00\text{mg/QE/g}$). Estes extratos apresentaram atividade antioxidante que variaram de ($49,93\% - 94,31\%$) (SILVA, COSTA, *et al.*, 2016).

Manrique (2008), em pesquisa com própolis da *Tetragonista angustula*, *Nannotrigona sp.* e geoprópolis da *Melipona compressipes* da Venezuela encontrou flavonoides nos extratos analisados, estes ainda apresentaram atividade antioxidante.

Atividade antioxidante e quantificação de fenólicos totais também são bastante relatadas em amostras de própolis da abelha *Apis mellifera* como no estudo de Cabral (2012) que descreve esta propriedade antioxidante ($53,9\%$), fenólicos totais ($169,6$ mg GA/g) e flavonoides ($6,15\text{mg QE/g}$) em amostras provenientes de Minas Gerais –MG. Popova (2004) apresenta flavonoides e fenólicos totais em própolis da Bulgária. Ainda amostras de própolis de Santa Catarina – SC apresentaram ($43,10 \pm 2,88\text{mg/g}$) de fenólicos totais e ($3,75 \pm 0,41$) mg/g de flavonoides (TOMAZZOLLI, 2015).

Um estudo mais abrangente mostra a presença de atividade antioxidante variando de ($20\% - 70\%$), fenólicos totais ($31,2 \pm 0,7$ a $299 \pm 0,5$ mg GAE/100g) e flavonoides variando de ($2,5 \pm 0,8$ a $176 \pm 1,7$ mg/mL) em amostras de própolis da *Apis mellifera* de diversos países (Argentina, Brasil, Uruguai, Chile, China, Hungria, Tailândia, Ucrânia, Urbesquistão, Austrália, Bulgária, Nova Zelândia, África do Sul e EUA (KUMAZAWA, HAMASAKA e NAKAYAMA, 2004).

Observando-se outros trabalhos, os resultados desse estudo sugerem que tanto a própolis originária da abelha *Apis mellifera*, quanto de espécies sem ferrão possuem compostos fenólicos totais, flavonoides e apresentam atividade antioxidante. Os dados desta pesquisa apresentaram uma alta atividade antioxidante na geoprópolis da *Melipona quadrifasciata anthidioides* comparada com outros estudos na tabela 22.

As informações deste trabalho sugerem a presença de outros metabólitos secundários, os quais também exercem efeito antioxidante no extrato do geoprópolis da *M. quadrifasciata anthidioides*, além dos flavonoides. O total de flavonoides apresentou uma média de 10% dos fenólicos totais. No entanto, detalhes e informações sobre todos os componentes - incluindo caracterização estrutural e quantificação- não estão disponíveis nesta pesquisa. A caracterização e quantificação dos componentes químicos da geoprópolis é, portanto, essencial para um estudo mais aprofundado da atividade farmacológica e toxicológica. Estas serão realizadas posteriormente.

Os compostos fenólicos enquadram-se em diversas classes de metabólitos secundários, como flavonoides, taninos, fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, estilbenos, dentre outros (SOUSA, 2007). Existem diversos tipos de antioxidantes, e um deles são os compostos fenólicos, como por exemplo, os flavonoides (MORAIS, CAVALCANTI, *et al.*, 2009). Os flavonoides são um exemplo de antioxidantes naturais presentes na maioria das plantas, e atuam diminuindo a velocidade da oxidação, e conseqüentemente uma menor incidências de patologias adquiridas pelo estresse oxidativo (MORAIS, CAVALCANTI, *et al.*, 2009).

4.6.1 Análise estatística

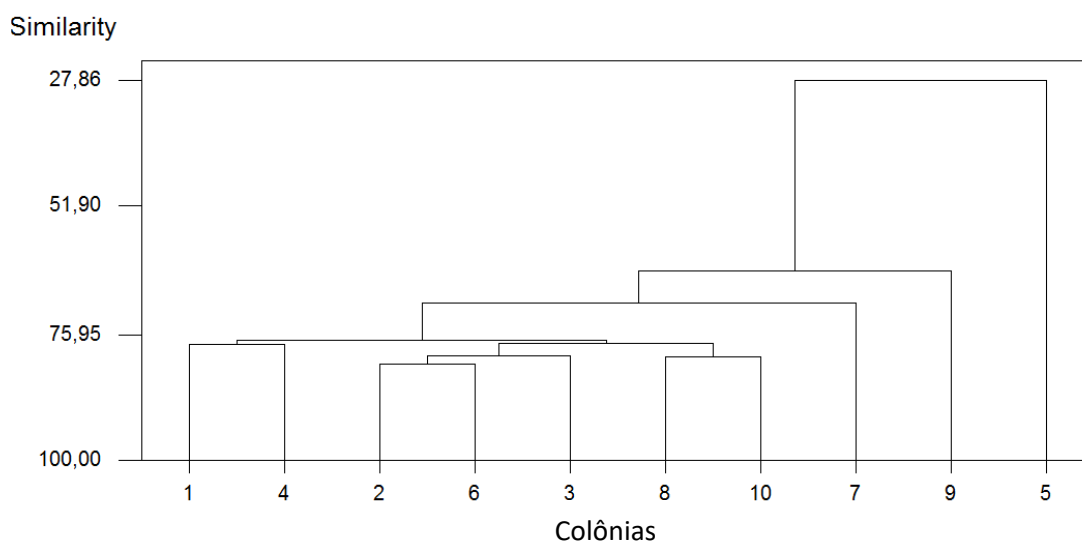


Gráfico 19: Dendrograma das amostras da extração etanólica

De acordo com o gráfico de PCA pode-se observar que aproximadamente 70% das amostras coletadas possuem 75% de similaridade entre si, ou seja a composição básica dos extratos da geoprópolis das 10 colônias quando comparados mudou. Resta saber se os ativos presentes estão nos 75% de similaridade ou nos 25% de diferença. A variabilidade química praticamente não mudou. Resta saber se os ativos presentes estão nos 75% de similaridade ou nos 25% de diferença.

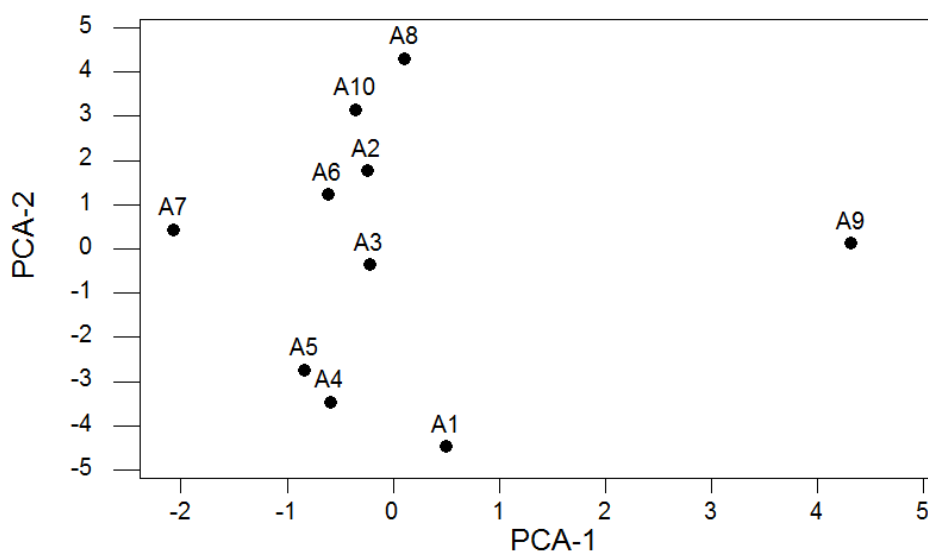


Gráfico 20: PC1 x PC2 do perfil químico extração etanólica

4.7 Atividade antimicrobiana

Os resultados encontrados no teste de microdiluição em caldo durante o período de incubação de 24 horas foram analisados utilizando um espectrofotômetro para Elisa modelo Multiskan Go e a olho nu pela observação do crescimento de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* através da alteração de cor do reagente INT, o qual as análises das imagens medem a intensidade da cor, resultando em alterações que representam a quantidade de formazano formado de acordo com o crescimento microbiano.

Após incubação, nos poços onde ocorreram crescimento bacteriano, o INT mudou de amarelo para púrpura. A cor amarela remanescente indica a ausência de crescimento microbiano.

O extrato etanólico da geoprópolis apresentou resultado satisfatório no teste de microdiluição em caldo realizado com a cepa de *E. coli* ATCC 22922, apresentando essa EC_{50} na concentração de 217mg/mL após 24 horas de incubação (Figura 36).



Figura 36: Placa após 24h de incubação. Comportamento do reagente INT em relação ao crescimento microbiano de *E. coli*. A cor amarela nos poços das colunas 1 a 5 indicam a ausência de crescimento microbiano; nas colunas 6 e 7 a coloração próxima à púrpura indica i

A cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, no entanto, não apresentou resultado satisfatório nas concentrações testadas, indicando alguma eventualidade/ viés. Será necessário aumentar as concentrações do extrato para realização de novos testes (Figura 37).

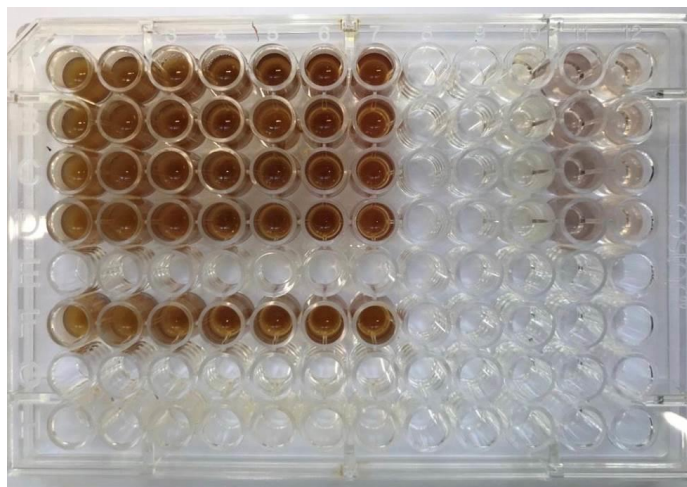


Figura 37: Placa após 24h de incubação. Comportamento do reagente NT em relação ao crescimento microbiano de *Staphylococcus aureus*. Há pouca variação de cor notável na placa.

Os valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) foram definidos como a menor concentração do extrato etanólico da geoprópolis em que ocorreu completa inibição de crescimento bacteriano da cepa bacteriana de *E. coli* ATCC 22922 ou que não rendeu microrganismos viáveis (Gráfico 21).

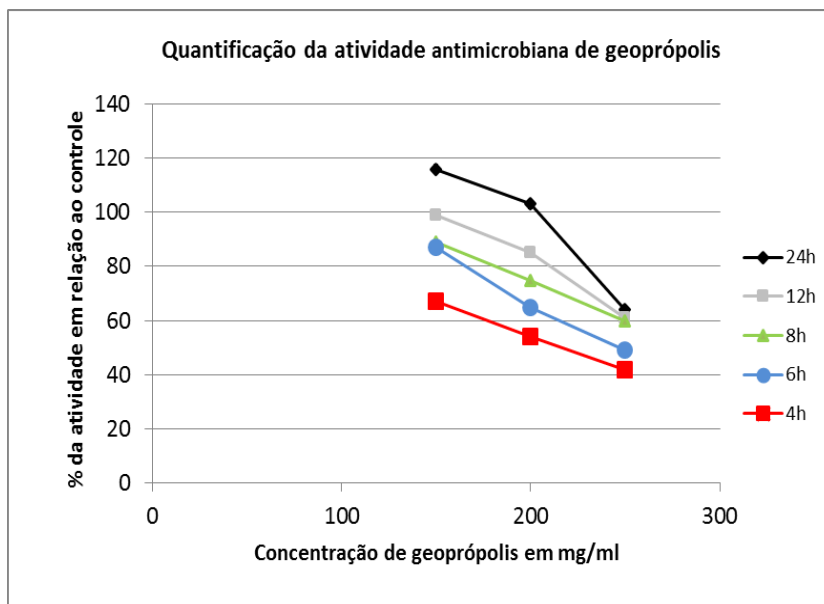


Gráfico 21: Análise do efeito negativo das diferentes concentrações do EEGP na atividade da desidrogenase de *E. coli* após 4h, 6h, 8h, 12h e 24h de incubação.

A cepa ATCC 22922 de *E. coli* foi classificada como sensível ao extrato etanólico da geoprópolis utilizado neste estudo, que apresentou EC_{50} na concentração de 217mg/mL após 24 horas de incubação (gráfico 22).

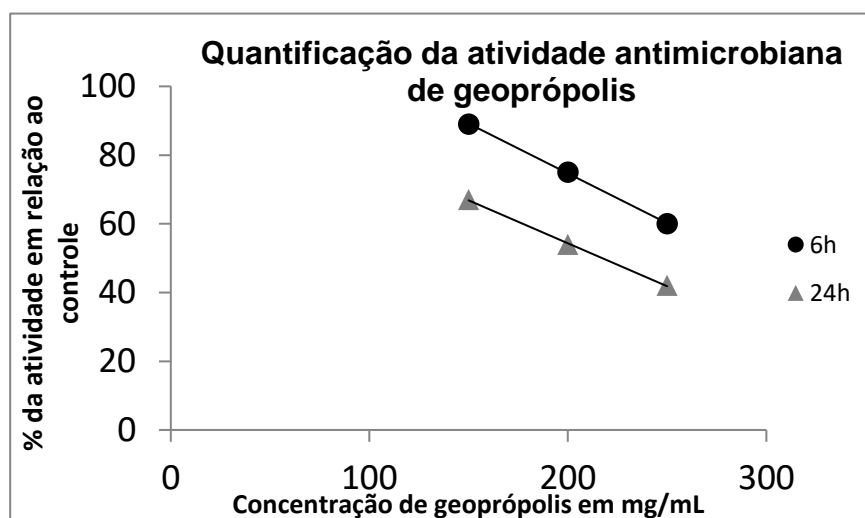


Gráfico 22: Análise do efeito negativo do EEGP na atividade da desidrogenase de *E. coli* após 6 e 24h de incubação. Utilizando uma regressão linear foi calculada a concentração de EEGP que diminuiu a atividade da desidrogenase em 50% (EC_{50} equivalente a 284 mg/ml e 217mg/mL respectivamente).

Na análise do antibiograma, foi verificada uma maior susceptibilidade da bactéria *Staphylococcus aureus*, formando um halo de inibição de 29 mm após 24 horas de incubação (Figura 38). A *E. coli*, no entanto, não se mostrou tão susceptível ao extrato de geoprópolis (Figura 39).

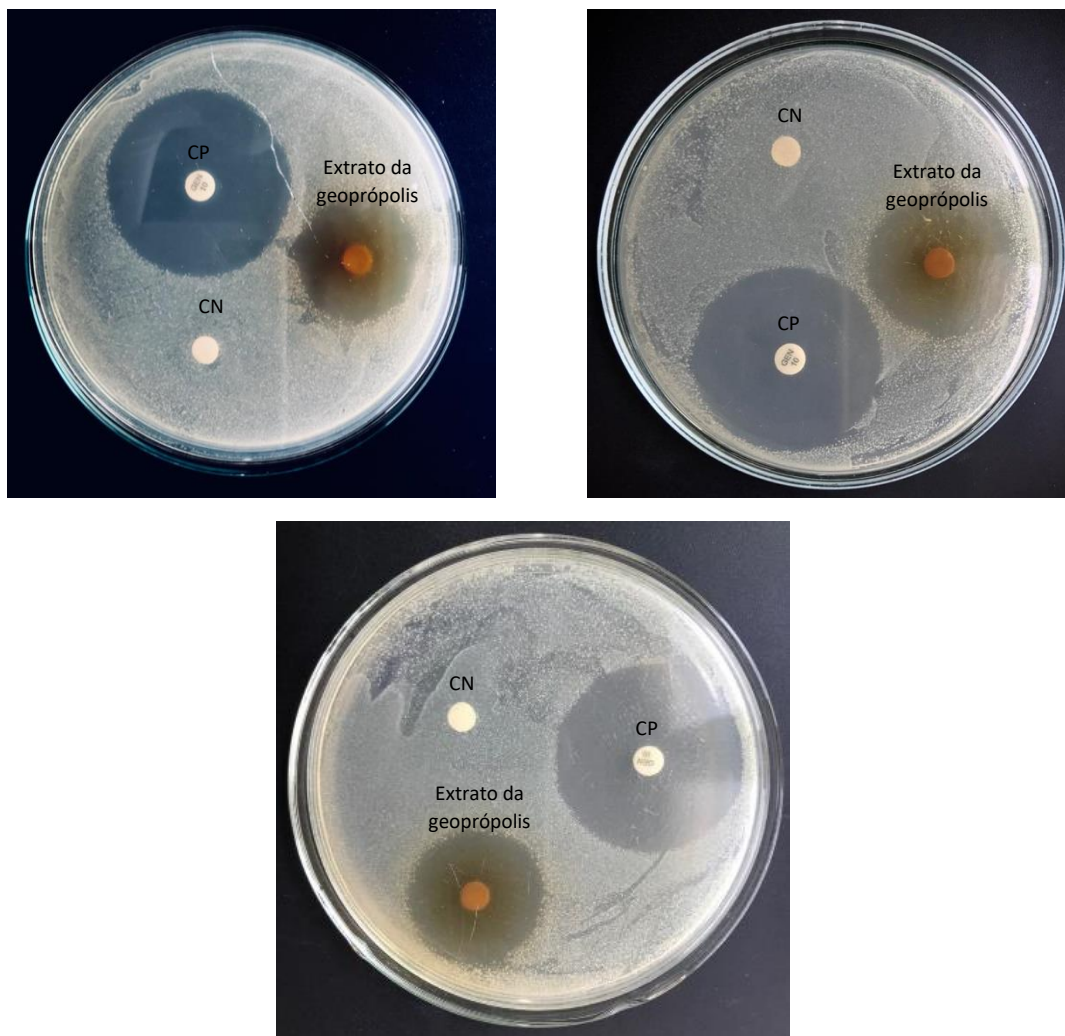


Figura 38: Avaliação da susceptibilidade do extrato etanólico da geoprópolis contra *Staphylococcus aureus* (triplicata). Legenda: CN (controle negativo), CP (controle positivo)

No trabalho realizado por (SANTOS, J. F. C., *et al.*, 2017), o extrato da geoprópolis da *Melipona q. anthidioides* promoveu a morte de todas as bactérias gram-positivas testadas, bactérias gram-negativas e leveduras, e foi apresentado como primeiro relato que mostra que a geoprópolis dessa subespécie de abelha pode ser utilizada na prevenção e tratamento de doenças relacionadas às infecções microbianas.

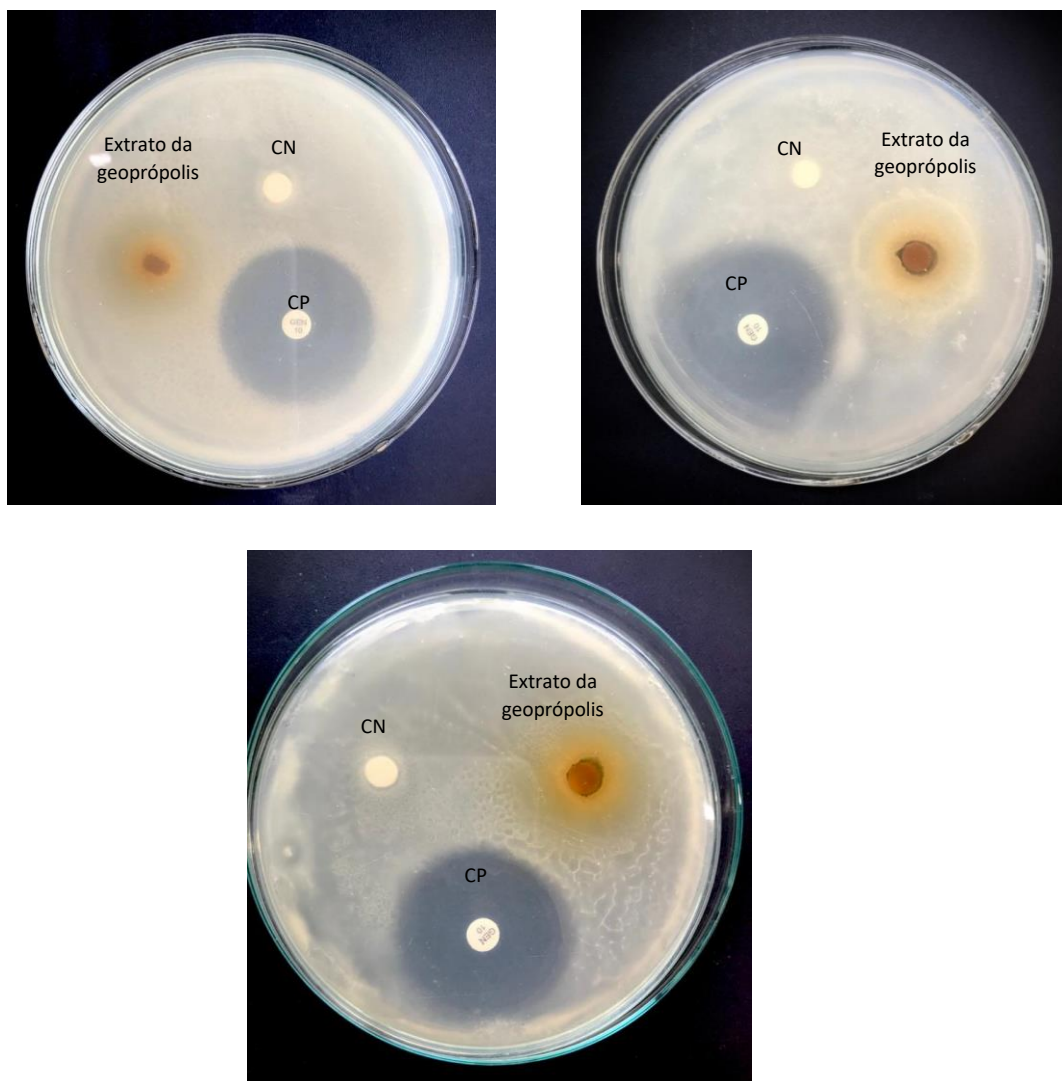


Figura 39: Antibiograma que avaliou a susceptibilidade do extrato etanólico da geoprópolis contra *E. coli* (triplicata). Legenda: CN (controle negativo), CP (controle positivo).

Esta pesquisa revelou que o extrato etanólico da geoprópolis da abelha *Melipona quadrifasciata anthidioides* apresenta efeito antimicrobiano inibitório significativo contra a bactéria Gram negativa *Escherichia coli* no teste de microdiluição em caldo ele não é observado no antibiograma que praticamente

não é visualizado formação de halo de inibição de crescimento. No entanto o antibiograma desmostrou atividade antibacteriana positiva contra *Staphylococcus aureus*. Diferente de Araújo (2013) que não observou ação antibacteriana contra *S. aureus* e *E. coli* em extratos da geoprópolis da *Melipona fasciculata* havendo inibição destas linhagens somente com altas concentrações do extrato. Contudo, a associação do extrato da geoprópolis com antibióticos favoreceu a ação do cloranfenicol sobre *S. aureus*.

A atividade bactericida do extrato utilizado neste trabalho possui diferentes concentrações inibitórias mínimas a depender da concentração e do tempo de incubação para cada cepa e pode ser explicado por diversas variáveis. Os resultados obtidos demonstram a capacidade do extrato em inibir o crescimento bacteriano de *Escherichia coli*, sendo a cepa ATCC22922 classificada como sensível.

Estes resultados corroboram com os dados de Velikova et al. (2000) que descreveram atividade antibacteriana de isolados da geoprópolis da abelha *Melipona quadrifasciata anthidioides* contra *S. aureus* e *E. coli*. Estes autores em outro trabalho ainda investigaram a atividade antibacteriana da própolis de outras espécies de abelhas sem ferrão brasileiras como a *Tetragonisca angustula* que apresentaram extratos ativos contra *S. aureus*, *E. coli* e *Candida albicans* (VELIKOVA. e M., 2000)

Segundo Lima (2015),o extrato de geoprópolis da abelha Manduri apresentou excelente atividade antibacteriana contra *S. aureus* (cepa ATCC) com valor de CIM de 0,93 mg/ml e CBM de 1,87 mg/ml. No entanto, os extratos de geoprópolis das abelhas Mandaçaia e Jataí (CIM de 3,7 mg/ml e CBM de 7,5 mg/ml) mostraram uma atividade moderada frente a esta espécie de bactéria. Ainda de acordo com este autor a amostra de Mandaçaia foi a única que apresentou atividade antimicrobiana frente a *E. coli* com valor de CIM de (15 mg/ml).

Suleman et al (2015), encontrou atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* em extratos etanólicos de própolis de *Apis mellifera* africano. Ele atribui esta propriedade a flavonoides presentes neste ativo.

Bankova et al. (2000) examinaram as atividades antibacterianas de diferentes frações da própolis brasileira para *Staphylococcus aureus*, e observou que esta atividade é devida principalmente à presença de compostos fenólicos.

Serra & Escola (1995) pesquisaram a atividade antimicrobiana de compostos fenólicos encontrados em 12 amostras de própolis diferentes, os mesmos estabeleceram uma relação entre os flavonoides e uma atividade bacteriostática. O MIC de 60 a 80 g / mL de própolis era necessário para inibir *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*, enquanto um mínimo de 600-800 g / mL do extrato da própolis era necessário para inibir *Escherichia coli*.

Suspensões de nanopartículas contendo própolis apresentaram atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, com valores de concentração inibitória mínima (MIC) que variaram de 156 μ g/mL - 310 μ g/mL. No estudo de citotoxicidade in vitro, os valores de concentração inibitória 50% (IC50) das suspensões variaram de 122,2 a 159,1 μ g/mL (MACHADO, 2017).

Pesquisas com outros microorganismos mostraram que os extratos etanólicos da geoprópolis da mandaçaia, coletados em épocas diferentes testados frente a cepas padrões de leveduras do gênero *Candida*. Segundo os autores os resultados dos estudos in vitro apresentam-se positivos, inibindo o crescimento de *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii* e *Candida parapsilosis* em Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de até 62,5 μ g / mL (SILVA, CAMARA e SOUZA, 2019)

Trabalho realizado por Miorin, (MIORIN, LEVY-JUNIOR, et al., 2003) mostrou atividade antimicrobiana para própolis de *A. mellifera*, com MIC variando de (0.36 a 3.65 mg ml⁻¹) e para *T. angustula* (0.44 - 2.01 mg ml⁻¹).

Segundo Bankova, (2005) o sinergismo de componentes fenólicos com outros compostos químicos são os responsáveis pela ação antimicrobiana da própolis e geoprópolis.

A atividade bactericida encontrada neste trabalho qualificou o extrato etanólico da geoprópolis como um produto promissor, o que possibilita a incorporação como princípio ativo em diferentes formulações alternativas a serem usadas no tratamento de infecções, principalmente da pele considerando-se o crescente aumento de microrganismos multirresistentes a antibióticos em geral.

Tabela 23: Tabela comparativa da atividade antimicrobiana de diferentes própolis.

Microorganismos testados	Metodologia	Espécie	Região	Referência
<i>E. coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	Determinação da Concentração Inibitória Mínimo (CIM)	<i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i>	BA	ESTA PESQUISA
<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	CIM (0,1- >14,0)	<i>Apis mellifera</i>	Cuba	MILAGROS, 2006
	CIM	<i>Nannotrigona testaceicornis</i> , <i>Plebeia droryana</i> , <i>Scaptotrigona bipunctata</i> , <i>S. postica</i> , <i>Tetragonisca angustula</i> e <i>T. spinipes</i>	*	LEVY Jr. (1997)
<i>S. aureus</i> , <i>Candida albicans</i> e o vírus influenza	CIM	<i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i> , e <i>Melipona compressipes</i> .	PR, PI	KUJUMGIEV et al. (1999)
<i>C. albicans</i> , <i>E. coli</i> , <i>Bacillus subtilis</i> e <i>S. aureus</i>	CIM	<i>T. angustula</i> e <i>A. mellifera</i>	*	PEREIRA et al., 2003
<i>Enterococcus faecalis</i>	CIM	<i>Scaptotrigona sp</i> e <i>M. fasciculata</i>	*	RIZZI (2005)
<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> os fungos <i>Cryptococcus neoformans</i> e <i>Candida albicans</i> .	CIM	<i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i>	MS	CAMPOS,2017
<i>Bacillus cereus</i> (CCT0198), <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922), <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923), uma de levedura <i>Candida albicans</i> (ATCC 10231), e cinco cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> metilina resistentes (MRSA)	CIM	<i>M. scutellaris</i>	PB	CABRAL,2014
<i>Shigella flexneri</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Candida albicans</i>	CIM	<i>Apis mellifera</i>	AL	JUNIOR,2012
<i>Staphylococcus aureus</i> ; <i>Escherichia coli</i> , e <i>Candida albicans</i>	CIM	<i>Apis mellifera</i>	Austria, Alemanha e França	HEGAZI,2000
<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus dysgalactiae</i> , <i>Streptococcus uberis</i> , <i>Streptococcus agalactiae</i> e <i>Escherichia coli</i> . Para a atividade antifúngica, os extratos foram avaliados frente à <i>Candida lipolytica</i> , <i>Candida parapsilosis</i> , <i>Sporothrix schenckii</i> e <i>Sporothrix brasiliensis</i> . Par a atividade antiviral e virucida, foram avaliados frente a Herpes Virus Bovino tipo-1 e 24 Vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV).	CIM	<i>Apis mellifera</i> e <i>Tetragonisca angustula</i>	RS, SC	PETER,2015
<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA, <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC, <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CIM	<i>Melipona quadrifasciata</i> , <i>Melipona marginata</i> e <i>Tetragonisca angustula</i>	PR	LIMA,2015
<i>Staphylococcus aureus</i>	CIM	<i>Apis mellifera</i> e <i>Tetragonisca angustula</i>	PR, MG	MIORIN,2003
<i>Enterococcus faecali</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i>	CIM	<i>Apis mellifera</i>	BR	SULEMAN,2015

4.8 Microorganismos x substâncias identificadas

Utilizou-se como ferramenta estatística para correlacionar os dados através de técnica de multivariância, com aplicação do PCA. O programa estatístico empregado foi o PAST versão 3.21. Foram cruzados os dados obtidos a partir dos espectros das substâncias identificadas no extrato etanólico em todas as colônias com a ocorrência ou ausência dos microorganismos descritos abaixo.

Para esta análise considerou-se (A) *Bacillus cereus*, (B) Bactérias aeróbias mesófilas, (C) bolores e leveduras, (D) Clostrídios sulfito redutores a 46°C (E) Coliformes a 45°C, (F) *Escherichia coli*, (G) *Estafilococos* coagulase positiva, (H) *Salmonella sp.*

CA – Kampferol ausente	NP – Naringenina presente
CP – Kampferol presente	NA – Naringenina ausente
AGP – Ácido gálico presente	KP – Campferide presente
AGA – Ácido gálico ausente	KA – Campferide Ausente

A análise de multivariância mostrou uma tendência de relação da ocorrência de ácido gálico com a presença dos microorganismos B e C para as colônias estudadas (gráfico 23).

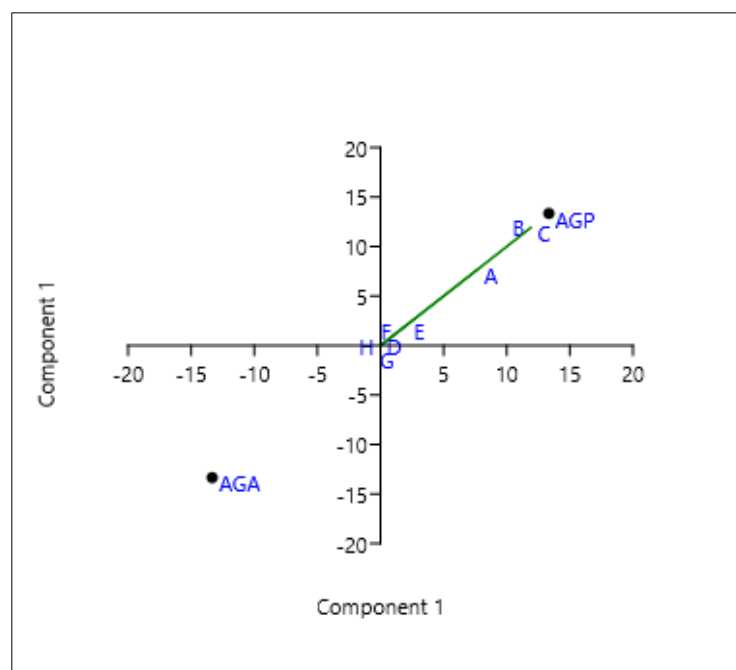


Gráfico 23: Gráfico de dispersão: ácido gálico x microbiota estudada/ AGP ÁCIDO GÁLICO PRESENTE / AGA – ÁCIDO GÁLICO AUSENTE

Ao analisar a possível relação da naringenina com a presença dos microorganismos estudados foi possível evidenciar que a presença de naringenina tende a coincidir com a presença de A, B e C e a ausência de D, E, F, G e H (gráfico 24).

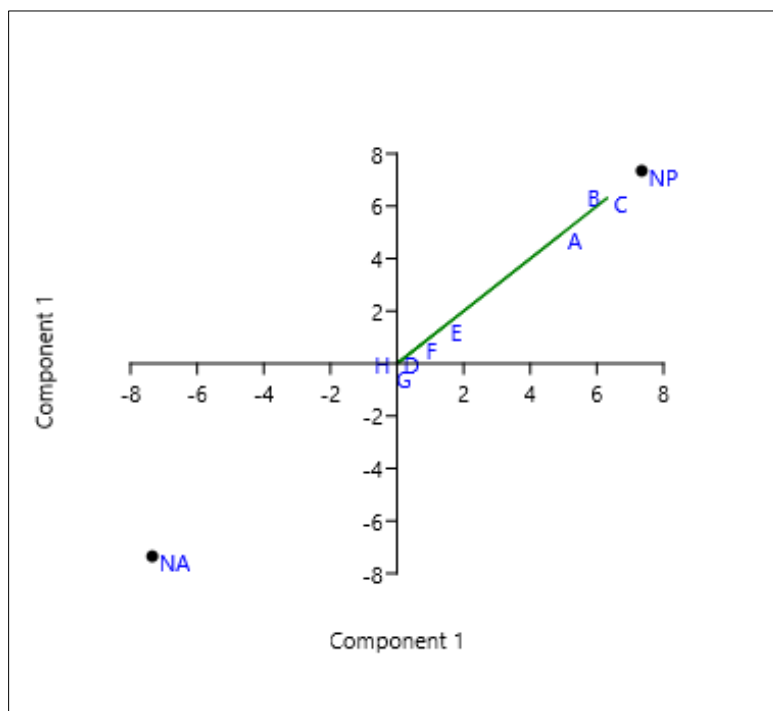


Gráfico 24: Gráfico de dispersão: naringenina x microbiota estudada
NP: Naringenina presente / NA: Naringenina ausente

O gráfico 25 mostra a tendência de que a presença dos microorganismos A e E pode ser influenciada pela ausência do kampferol.

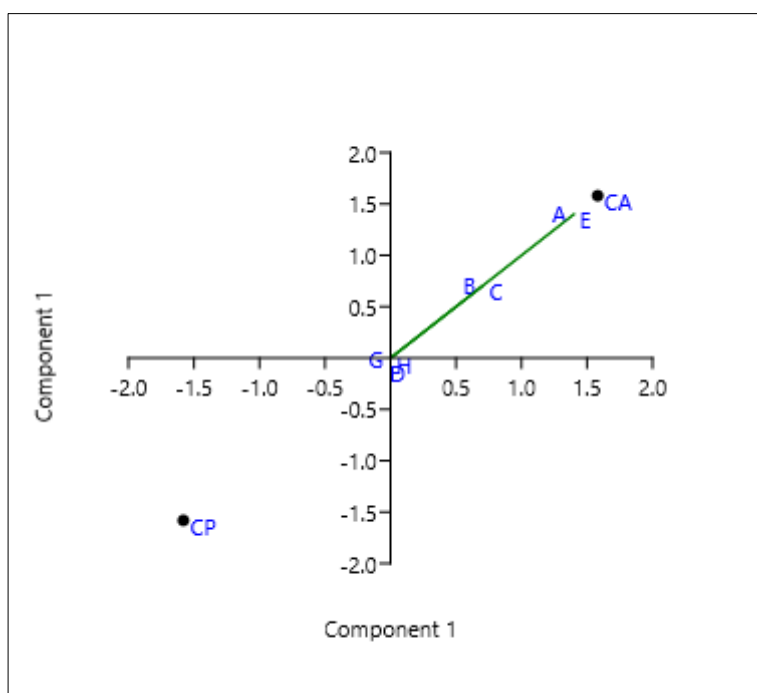


Gráfico 25: Gráfico de dispersão: Kampferol x microbiota estudada

Para o Campferide, analisando o gráfico 26, percebe-se a tendência de B e C ocorrer na presença deste ativo.

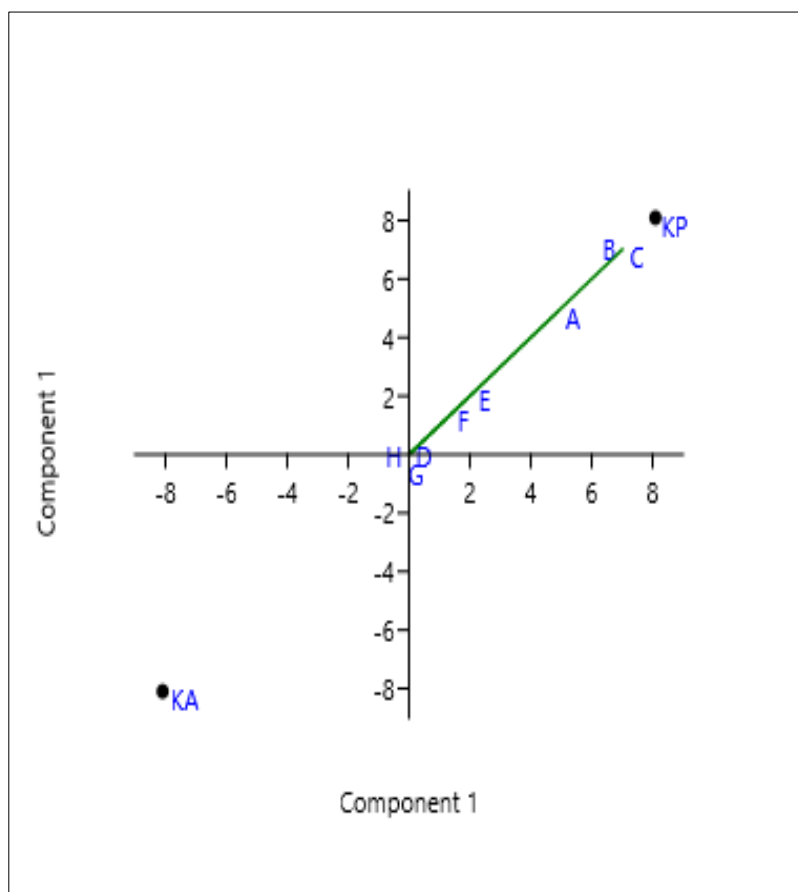


Gráfico 26: Gráfico de dispersão: Campferide x microbiota estudada

Outros trabalhos relacionados à quantificação de microrganismos na própolis foram desenvolvidos, porém foram trabalhos analisando própolis produzida por *Apis mellifera*, sendo ainda poucos trabalhos com geoprópolis de abelhas sociais sem ferrão. Segundo Matsuda (2002), técnicas de irradiação gama para preservação de própolis permitiu a diminuição da carga microbiana para níveis não detectáveis, devendo ainda ser utilizada como ressalva por ser um tratamento capaz de reduzir adequadamente a carga microbiana sem, contudo, afetar as propriedades que a caracterizam.

Até o momento, poucos trabalhos abordaram, sob alguma perspectiva, a microbiota intestinal de abelhas sem ferrão da *Melipona quadrifasciata*, (VÁSQUEZ e ET.AL., 2012). Recentemente, um estudo pioneiro apresentou uma

abordagem comparativa da microbiota intestinal de abelhas corbiculadas de diferentes continentes (KWONG e ET.AL., 2017).

A microbiota intestinal das abelhas pode também exercer funções extracorpóreas, uma vez que a produção dos alimentos na colônia ocorre a partir da inoculação de secreções e microrganismos do trato digestório das abelhas nos recursos coletados (néctar, pólen e própolis) (LEE, 2014).

A elucidação da diversidade de microrganismos que vivem em simbiose com abelhas sem ferrão é importante para o melhor entendimento das relações ecológicas que mantêm o equilíbrio das populações nativas e de seus processos vitais na colônia. Igualmente, essa diversidade de microrganismos também atrai atenção do ponto de vista biotecnológico, para a prospecção de produtos bioativos de interesse médico e industrial. Nas últimas décadas, a elucidação de simbioses microbianas na natureza culminou no reconhecimento crescente de que produtos naturais isolados de plantas e animais são na maioria das vezes produtos metabólicos derivados de seus microrganismos coexistentes (CHALLINOR e BODE, 2015).

Existem pouca informação sobre as funções desempenhadas pelos microrganismos associados à maturação dos produtos das abelhas dentro das colônias destas. Mas, no contexto de abelhas sem ferrão, há inicialmente uma falta de dados relacionados à composição microbiana de suas provisões alimentares e outros elementos da colônia. São também incipientes os trabalhos envolvendo a descrição da microbiota da própria abelha. Assim como na maioria dos animais, nas abelhas as comunidades microbianas são mais abundantes no trato digestório e podem afetar o seu potencial nutricional e imunológico, bem como outros aspectos fisiológicos (ENGEL e MORAN, 2013).

Estes resultados contribuem com dados inéditos que podem servir para o entendimento das relações simbióticas existentes em colônias de abelhas *M. q anthidioides* da região semiárida. A investigação da diversidade bacteriana associada a essas abelhas é um ponto de partida fundamental para os avanços nos estudos em microbiota dessas espécies sem ferrão, esta inquirição serve como fonte de informação para novos estudos com abelhas sociais nordestinas.

Esta pesquisa serve de referência para futuros trabalhos de qualidade da matéria prima desta natureza contribuindo também para o estabelecimento de Procedimentos Operacionais Padrões POPs em laboratórios e indústrias. Estes ainda podem convir alusão para estabelecimentos de parâmetros da legislação acerca de produtos das abelhas nativas brasileiras (melíponas).

O conhecimento dos microrganismos simbióticos contribui para o entendimento das relações ecológicas que garantem a homeostase da colônia, bem como fornece ferramentas para a prospecção de produtos de interesse biotecnológico como antibióticos e conservantes.

4.9 Formulação do Pluronic Lechitin Organogel (PLO) incorporado do Extrato Etanólico da geoprópolis (EEGP 5%).

Os resultados da formulação piloto, empregando o organogel incorporado do EEGP 5%, foram apresentados no 22º Simpósio Internacional de Microencapsulação, realizado em Salvador-Ba, Brasil no período de 25 a 27 de setembro de 2019 (APÊNDICE V).

A própolis tem sido usada em uma variedade de aplicações, que incluem géis, cremes e pomadas para cicatrização de feridas e tratamento de queimaduras. Berretta et al. (2012) desenvolveram um gel Polaxamer 407 contendo 3,6% de própolis para cicatrização de feridas e sugeriram que a nova formulação pode oferecer uma alternativa terapêutica para tratar lesões de pele. Atualmente não existem trabalhos em que se utiliza o extrato da geoprópolis como ativo deste tipo de formulação.

pH

A determinação do pH de uma preparação para aplicação cutânea estabelece um parâmetro extremamente importante, uma vez que cada produto deve apresentar pH compatível com a região do corpo onde se aplica (NETO, 2015).

O pH em torno de (5,0-6,0) mensurado na formulação, contendo o extrato da geoprópolis utilizada nessa pesquisa, em temperatura ambiente 25º C e com

5°C, não variou com 21 dias, é compatível com o pH normal da pele em homens de (4,6±0,3) e mulheres (5,1±0,4) (LUEBBERDING S, 2013). Estes resultados corroboram com os encontrados por Balata et al. (2014) que relatou valores de pH (5,5-6,3) para organogel contendo própolis e sugerem um baixo risco de irritação da pele.

Segundo o estudo de Andrade, (2017) verificou-se ao final de 60 dias que o pH de amostras de PLO contendo flavonoide armazenadas a 25° C e 5° C apresentaram um pequeno decréscimo (5,8 e 6,0, respectivamente) e as amostras armazenadas a 45° C apresentaram um aumento (7,1). No entanto, todas as amostras permaneceram com o pH compatível ao pH da pele (4,5-7), demonstrando que a temperatura não influenciou na estabilidade química dos componentes na formulação e do princípio ativo (IBRAHIM, HAFEZ e MAHDY, 2013).

Outro trabalho formulou lipossomas contendo ácidos terpênicos e observou que o pH se aproxima do 5,5. Assim, o autor infere que há ausência, ou pouca interferência do preparado na fisiologia normal da pele, preservando o filme hidrolipídico e ajudando na penetração cutânea do sistema de liberação lipossomado (NETO, 2015).

Saerten et al. (2005) afirmaram ainda que a variação de pH favorece a hidrólise dos lipídeos e que um pH em torno de 6,0 é mais favorável para manter a estabilidade da formulação.

Logo após o preparo da formulação, através da microscopia óptica foi possível observar a presença do EEGP 5% incorporado ao organogel, aparentemente estruturas achatadas em seu interior de acordo com a coloração característica do extrato em destaque na (Figuras 40 e 41), observando também a possível ocorrência de bicamadas e/ou monocamadas lipídicas.

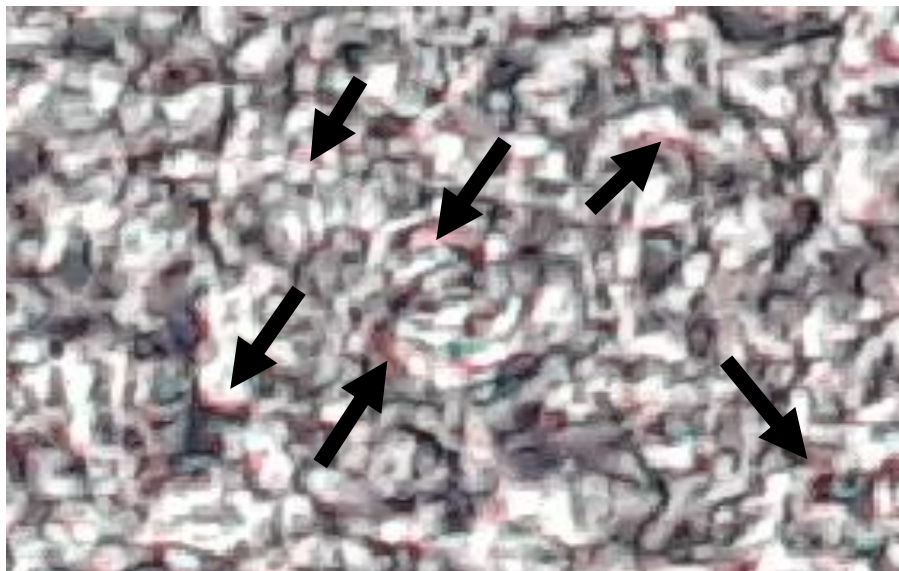


Figura 40: Observação da formulação PLO-EEGP 5% em microscópio óptico: Olympus optical model CX40RF100- Objetiva 100x. Fonte: (autor)



Figura 41: Observação da formulação PLO-EEGP 5% em microscópio óptico: Olympus optical model CX40RF100- Objetiva 40x. Fonte: autor

Entretanto não foi observada a formação de vesículas em forma circular com superfície topográfica acentuada e nem mensurado seu diâmetro médio neste trabalho. De acordo com Neto, (2015) os atributos dos lipossomas em sistemas *in vitro* e *in vivo* são fortemente condicionadas a seu tamanho médio e a homogeneidade das formulações lipossomais. Desta forma, novos experimentos utilizando microscopia eletrônica devem ser realizados, a fim de identificar e mensurar as vesículas contendo os ativos do extrato da geoprópolis da *Melipona quadrifasciata anthidioides* e, assim, estabelecer padrão de controle de qualidade da produção.

A incorporação de substâncias ativas em microemulsão fosfolipídica não é uma tarefa simples, porém o experimento demonstrou ser possível a encapsulação do EEGP 5% no PLO. Estes resultados corroboram com o de Cerqueira, (2019) que evidenciou a eficiência no processo de encapsulação da própolis vermelha do estado de Alagoas-AL. Outro trabalho também mostrou eficiência em torno de (70-79%) na microencapsulação das própolis verde, marron e vermelha brasileira (ANDRADE., J. K. S., *et al.*, 2018).

De acordo com Oliveira (2009), algumas características organolépticas constituem o indicativo mais acessível para se avaliar a qualidade de uma preparação semisólida e para detectar alterações. O simples exame visual pode funcionar como um indicativo, por vezes perfeito, da homogeneidade da preparação.

Após 21 dias, armazenado em refrigerador a aproximadamente 10°C, a homogeneidade da formulação (EEGP-PLO 5%) foi perdida e o produto adquiriu um aspecto heterogêneo. A formulação apresentou separação das fases descaracterizando o produto em questão (Figura 42). Jagdale et al (2015) ao avaliarem a estabilidade do gel PLO contendo tapentandol, um analgésico opióide, obteve resultados semelhantes, observando que em temperatura em torno de 4°C a formulação sofreu modificações.

Andrade (2017), também verificou que amostras do PLO armazenadas a 5°C apresentaram-se mais fluidas após 7 dias, com leve alteração de cor. As alterações observadas são atribuídas a característica termorreversível do polaxamer, que em baixas temperaturas se dispersa em água e liquefaz. (SOUZA & FERREIRA, 2010).

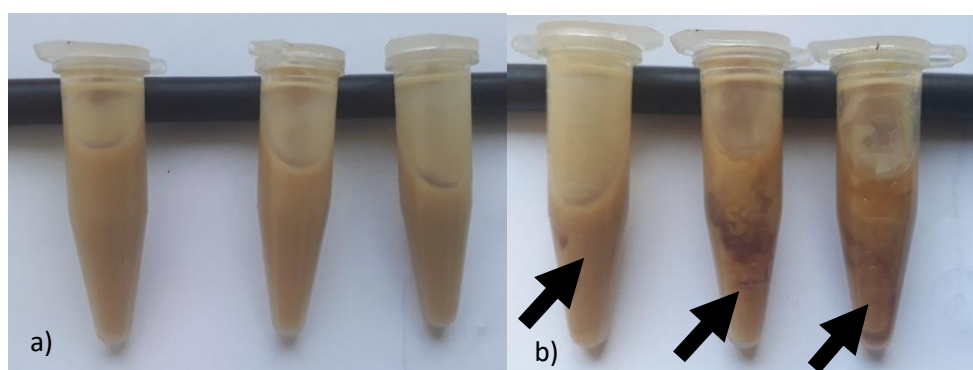


Figura 42: Observação da separação de fases na formulação piloto PLO-EEGP 5%, a) Formulação observada após 24h e após 21 dias (b).

Andrade, (2017) evidenciou que uma formulação de PLO contendo rutina, armazenado na temperatura de 5 °C, após 15 dias, houve uma pequena diminuição nos valores (0,88 e 0,87 g/cm³). Segundo Gupta et al. (2010), estes valores de densidade abaixo de 1 podem ser indicativos de alta atividade de água na formulação, o que pode desencadear instabilidades físicas.

De acordo com Lopes (2014), o comportamento de lipossomas, tanto em relação à estabilidade de armazenamento, como em meios biológicos, é determinado por fatores como tamanho de partícula, carga de superfície, concentração de amostra e pelas propriedades da solução. Desta forma, é fundamental a determinação e controle de tais parâmetros para assegurar a eficiência e a estabilidade das formulações dos lipossomas.

Foi apurado também a formação de odor característico de rancificação oxidativa após os 21 dias tornando a formulação preparada intensamente modificada. Diferente do trabalho de Andade (2017), que verificou amostras de PLO contendo como ativo um flavonoide armazenado a 25°C, estas mantiveram suas características durante todo experimento, apresentando apenas leve modificação em seu odor após 60 dias, mas com odor característico durante todo o tempo. As amostras armazenadas a 45° C apresentaram modificação de cor e odor após 15 dias e aspecto levemente alterado, para mais denso, após 30 dias.

Esses problemas podem ser superados pela conservação dos lipossomas em atmosfera de nitrogênio e argônio, pelo uso de antioxidantes como alfa-tocoferol na preparação, como também pela liofilização da formulação final com a ajuda de um crioprotetor. A liofilização aumenta a meia-vida da formulação lipossômica, pela maior estabilidade em estado seco, podendo ser reconstituída com veículo na hora da administração (Cacela, Hinch, 2006; Sharma, Sharma, 1997).

Os fosfolipídios, componentes das bicamadas dos lipossomas, são moléculas anfifílicas que, quando dispersos em água, podem formar diferentes fases. Dependendo da temperatura, geometria molecular dos lipídeos e as condições da mistura lipídeo/água, essas moléculas podem se organizar de diferentes formas, podendo ser classificados principalmente em fase lamelar, fase

cúbica e fase hexagonal, de acordo com suas diferentes estruturas internas (Koynova e Tenchov, 2013).

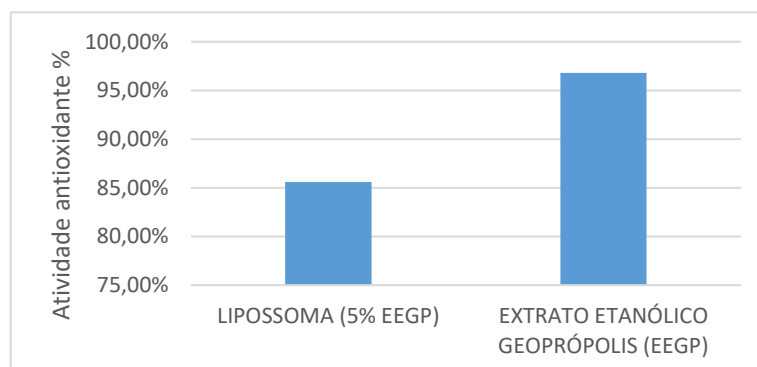
Quando armazenada à temperatura de (5°C), a formulação do (PLO-EEGP 5%) mostrou-se mutável fisicamente; verificou-se sinais de instabilidade física como separação de fases e coalescência. Entretanto não houve variações bruscas de pH que poderiam causar irritabilidade cutânea. Serão necessárias avaliações complementares, como estabilidade de prateleira, fotoestabilidade e doseamento do ativo, a fim de se obter informações mais delineadas sobre a estabilidade da formulação.

São imprescindíveis também estudos a respeito da instabilidade dos encapsulados com geoprópolis em diferentes formulações e temperaturas. Além de observar-se que há uma necessidade de padronizar os métodos utilizados no preparo deste organogel (PLO) com a geoprópolis, com intuito de descrever tamanho, lamelaridade, propriedades elásticas, carga, espessura da bicamada e polaridade. Uma vez que a taxa de encapsulação de uma substância em lipossoma e a relação substância encapsulada/lipídeo são parâmetros importantes que devem ser considerados no momento do preparo de uma formulação. Ambos estão relacionados com a capacidade de encapsulação de uma substância no lipossoma. (FRÉZARD. F., 2005).

4.9.1 Potencial antioxidante do PLO-EEGP 5%

De acordo com o gráfico 27, podemos verificar que houve redução na atividade antioxidante da formulação lipossomal (PLO-EEGP 5%) que apresentou (85,60%) comparada ao extrato seco (96,81%).

Gráfico 27: % de potencial antioxidante: Formulação PLO-EEGP 5% x EEGP/



Fonte: autor

A diminuição da atividade antioxidante do produto formulado pode estar atrelada à desestabilização verificada com a separação de fases do (PLO-EEGP 5%) após 21 dias. Estes resultados estão de acordo com os estudos de Andrade, (2018) que verificou pequena queda em valores de atividade antioxidante das micropartículas de própolis preparadas em relação à atividade antioxidante da própolis não encapsulada.

Apesar da diminuição do potencial antioxidante do produto formulado (PLO-EEGP 5%) em relação ao extrato da geoprópolis, pode-se considerar ainda significativo potencial antioxidante resultante. De acordo com Neto, (2015) foi visualizado a preservação do efeito sequestrador de radical livre dos lipossomas contendo ácidos triterpênicos. Este efeito da atividade antirradical livre foi potencializado após o encapsulamento das moléculas e posterior incorporação em bases galênicas.

Isso foi observado por Kamel e Mostafa (2015) que avaliaram a atividade antioxidante da rutina incorporada em um carreador lipídico nanoestruturado e observaram que a redução do tamanho de partícula da formulação expõe uma área de superfície maior que a rutina livre, aumentando a atividade antioxidante. Ainda os resultados obtidos no estudo de Andrade (2017) sugerem que, quando veiculada em um sistema de liberação controlada, a rutina é capaz de apresentar um potencial antioxidante significativo em baixa concentração, ao contrário do que acontece quando está livre.

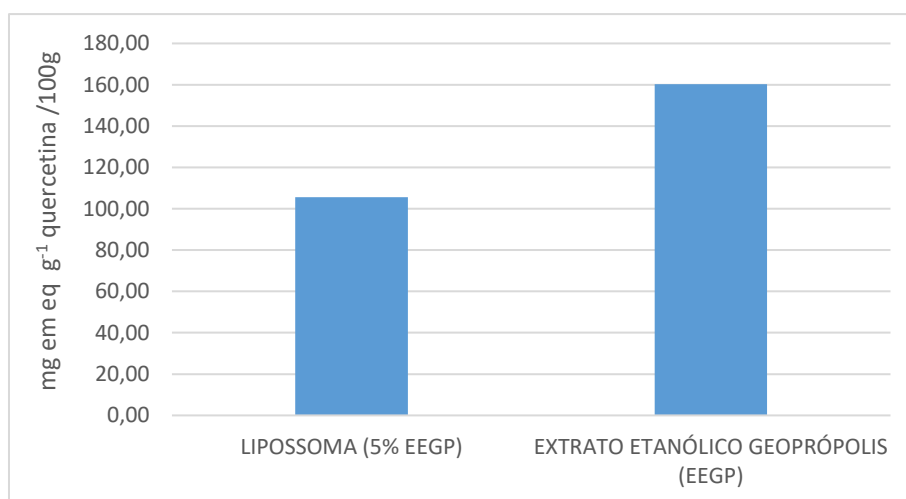
Segundo Sharma, (1997) a estabilidade de lipossomas pode ser afetada por processos químicos, físicos e biológicos. Dependendo da sua composição, as formulações finais dos lipossomas podem apresentar um curto tempo de meia-vida, em parte devido à instabilidade física e química.

Os processos químicos de instabilidade são dependentes da composição dos lipossomas, a qual implica na prevenção da hidrólise do éster e da oxidação da insaturação localizada na cadeia lipídica. Como apresentado por Saerten et al. (2005), a hidrólise lipídica leva à formação de um produto intermediário, a liso-fosfatidilcolina (liso-PC). A presença da liso - PC acentua a permeabilidade dos lipossomas, o que prejudica a integridade da formulação.

Essa redução de atividade antioxidante também foi acompanhada da redução de fenólicos totais na formulação do (PLO-EEGP 5%) com valores de $(105,65 \pm 0,20)$ comparada ao EEGP que apresentou $(160,26 \pm 0,06)$ mg em eq g^{-1} quercetina /100g (gráfico 13). A quantificação do teor de fenólicos totais foi realizada através de uma curva de calibração construída pela diluição de uma solução padrão de ácido gálico. A partir equação da reta ($y = 0,01358x - 18,157$) foi possível avaliar o teor de compostos fenólicos totais na formulação contendo (PLO-EEGP 5%), expresso em mg de ácido gálico equivalente por 100 g de extrato (gEAG.100g).

Estas informações corroboram com o trabalho realizado por Andrade, (2018) que, apesar das micropartículas de própolis apresentarem bons resultados de encapsulação, estas também mostraram redução dos conteúdos de fenólicos e flavonoides totais.

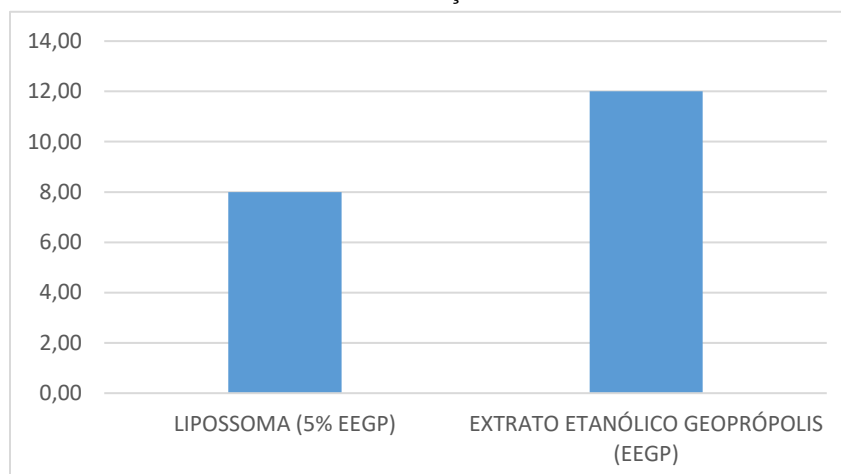
Gráfico 28: Fenólicos totais avaliados na formulação PLO-EEGP 5% x EEGP



Fonte: autor

Além da diminuição de compostos fenólicos também se verificou uma redução nos valores de flavonoides totais na formulação do PLO-EEGP 5% com valores de $(8,12 \pm 0,05)$ comparada ao EEGP que apresentou $(12,6 \pm 0,30)$ mg em eq g^{-1} ácido gálico /100g (gráfico 29).

Gráfico 29: Flavonoides totais da formulação PLO-EEGP 5% x EEGP



Fonte: autor

A estabilidade biológica depende da presença de agentes que interagem com os lipossomas, estando, portanto, vinculada com a via de administração (LASIC, 1998). De acordo com VERMURI & RHODES (1995), a avaliação da estabilidade deve incluir a caracterização do produto final e o acompanhamento da estabilidade durante o armazenamento da formulação lipossomal.

Apesar dos resultados promissores da formulação (PLO EEGP 5%) como a possibilidade da encapsulação contendo o ativo com propriedades antioxidantes da geopópolis da *Melipona q. anthidioides* e do pH mensurado na formulação ser compatível com o pH normal da pele em homens e mulheres, para a continuidade dos testes de estabilidade acelerada. De acordo com Silva, (2015) alguns métodos relevantes utilizados para padronização e caracterização de microencapsulados são necessários como o:

- Espalhamento de luz dinâmico (DLS): A técnica de espalhamento de luz dinâmico (Dynamic Light Scattering, DLS) é amplamente utilizada para medir o tamanho e a distribuição do tamanho de partículas em suspensão (LOPES, 2014).
- As medições do potencial zeta: são comumente utilizadas para avaliar as interações repulsivas entre as partículas e prever a estabilidade dos sistemas coloidais (LAOUINI, JAAFAR-MAALEJ, et al., 2012).

- Eficiência de encapsulação (EE): A caracterização dos lipossomas através da determinação da eficiência de encapsulação é de extrema importância, uma vez que a eficácia de lipossomas in vivo, bem como suas propriedades físico-químicas depende do total de composto ativo incorporado às nanoestruturas (LOPES, 2014).
- Espalhamento de raios-x a baixo ângulo (SAXS). consiste em uma técnica fundamental para o estudo da organização de sistemas vesiculares em nível molecular. A interação da radiação com a estrutura eletrônica e o seu subsequente espalhamento oferece informações detalhadas de aspectos estruturais que dificilmente poderiam ser obtidas por outras técnicas (MERTINS, 2008). A análise do SAXS permite a obtenção de informações referentes às mudanças estruturais dos lipossomas, desencadeadas após um estímulo específico (pH, temperatura, luz, etc.), o qual pode estar relacionado à desestruturação dos lipossomas com consequente liberação do material encapsulado (DONG e BOYD, 2011).
- A microscopia eletrônica de varredura (MEV), a microscopia eletrônica de transmissão (MET) e a criomicroscopia de transmissão (Crio-MET) são técnicas amplamente empregadas para visualização dos PL; sendo que a primeira permite observar a forma e as outras duas são mais precisas no que diz respeito à demonstração dos tipos de estruturas formadas permitindo avaliar a bicamada polimérica (LEE, FEIJEN e J., 2012).
- A microscopia de fluorescência permite estudar processos dinâmicos como difusão. (KITA-TOKARCZYK, 2005) A microscopia de força atômica (MFA) pode ser usada para avaliar características mecânicas da bicamada dos lipossomas (CHEN, SCHÖNHERR e VANCSO, 2009).

Entretanto alguns vieses durante a realização do experimento da formulação piloto (PLO-EEGP 5%) se mostraram intransponíveis no período, o que tornou inviável o prosseguimento dos testes de padronização e caracterização do sistema lipossomado.

Diante das informações relacionadas acima e acessibilidade a tais ferramentas para poder caracterizar a formulação do PLO incorporado da geoprópolis, optou-se neste momento por trabalhar com uma formulação semissólida do tipo creme inscrita no Formulário Nacional da Farmacopeia Brasileira assim com uma estabilidade mais bem definida. Dessa forma, buscou-se um veículo que pudesse traduzir uma melhor estabilidade e viabilidade frente a uma formulação semissólida desejada e assim aplicar os principais testes de estabilidade acelerada preconizados pela ANVISA.

4.10 Formulação semisólida (creme) e testes de estabilidade acelerada

O uso de ingredientes de origem natural em cosméticos ganhou popularidade e, entre eles, podem ser citados os extratos vegetais, óleos vegetais, óleos essenciais e seus derivados que, incorporados nas formulações, agregam bioatividade, funcionalidade e apelo de marketing (PRIEST, 2006).

Segundo Pinto, Prado & Carvalho (2011) existem diversos produtos a base de própolis, dentre eles: cápsulas, condicionador, xampu, sabonete, dentífrico, batom, bala, chá, protetor solar, gel pós barba, creme, pomadas, extratos, spray bucal, pastilhas, suspensão, xaropes, comprimidos, gotas nasais além de uma infinidade de cosméticos à base de própolis, como cremes faciais e outros disponíveis no mercado brasileiro.

Variáveis relacionadas à formulação, ao processo de fabricação, ao material de acondicionamento e às condições ambientais e de transporte, assim como cada componente da formulação seja ativo ou não, podem influenciar na estabilidade do produto (ISAAC, CEFALI, *et al.*, 2008).

O teste de estabilidade é considerado um procedimento preditivo, baseado em dados obtidos de produtos armazenados em condições que visam acelerar alterações passíveis de ocorrer nas condições de mercado. Essa estabilidade é relativa, pois varia com o tempo e em função de fatores que aceleram ou retardam alterações nos parâmetros do produto (ISAAC, CEFALI, *et al.*, 2008).

O estudo da estabilidade contribui para orientar o desenvolvimento da formulação e do material de acondicionamento; fornecer subsídios para aperfeiçoamento das formulações; estimar o prazo de validade e fornecer informações para sua confirmação; auxiliar no monitoramento da estabilidade organoléptica, físicoquímica e microbiológica, produzindo informações sobre a confiabilidade e segurança dos produtos. O teste de estabilidade acelerada em um intervalo de tempo pode ser considerado um teste orientativo no desenvolvimento de produtos. Consiste em submeter a amostra a condições extremas de temperatura, objetivando acelerar processos de instabilidade, para auxiliar na triagem de formulações e ser estimativo de vida útil do produto (ISAAC, CEFALI, *et al.*, 2008).

Os testes de estabilidade realizados na formulação semisólida preparada à base do extrato da geoprópolis da *Melipona q. anthidioides* apresentaram os seguintes resultados:

4.10.1 Centrífuga

A centrifugação promove estresse na amostra, simulando aumento na força da gravidade, aumentando a mobilidade das partículas e antecipando possíveis sinais de instabilidade, como precipitação, separação de fases, formação de sedimento compacto e coalescência (Brasil, 2007). A ANVISA recomenda que, antes do início dos testes de estabilidade, o produto seja submetido à centrifugação, durante 30 minutos, a uma velocidade de 3.000 rpm com três leituras para cada amostra. A ocorrência de instabilidade é indicativa da necessidade de reformulação.

Nenhuma das formulações preparadas (1,5%), (2,5%) e (5%) contendo o ativo da geoprópolis da *Melipona quadrifasciata anthidioides* apresentaram separação de suas fases (Tabela 24). A não ocorrência de separação de fases não assegura sua estabilidade, entretanto indica que o produto pode ser submetido, sem necessidade de reformulação, aos testes de estabilidade (ISAAC, 2008). Assim as amostras da formulação semisólida à base do extrato da geoprópolis utilizado neste estudo apresentaram-se inicialmente estáveis e puderam ser submetidas aos Testes de Estabilidade.

Tabela 24: Resultados dos testes de centrifugação nas formulações controle e (1,5%) (2,5%) (5%) à base da geoprópolis da *Melipona quadrifasciata anthidioides*

FORMULAÇÃO	TEMPO	CLASSIFICAÇÃO
CONTROLE	T ₀	N
	T ₃₀	N
1,5%	T ₀	N
	T ₃₀	N
2,5%	T ₀	N
	T ₃₀	N
5,0%	T ₀	N
	T ₃₀	N

Legenda: (T₀) tempo inicial, (T₃₀): tempo final após 30min, (N) Normal, sem alteração; (S) Separado; turvo ou precipitado; (LS) Levemente separado, turvo ou precipitado; (IS) intensamente separado, turvo ou precipitado. Fonte: autor

4.10.2 Gelo e degelo

O ciclo gelo-degelo é descrito por alguns autores (FRIEDRICH, FABIAN TEIXEIRA PRIMO e LUCIANE VARINI LAPORTA, 2007), como um procedimento que leva a avaliar a estabilidade antecipando os processos de separação passíveis de ocorrerem durante as condições normais de estocagem. Através desta análise verificam-se alterações importantes nas características físicas e organolépticas da formulação. O resultado deste teste para a base encontra-se na Tabela 25. Neste procedimento, a base não foi afetada pelas condições de estresse. Teve seu pH constante.

Após o ciclo, não houve alteração na consistência das formulações (1,5%), (2,5%) e (5%), do creme à base do extrato da geoprópolis da *Melipona quadrifasciata anthidioides* desta forma não ocorreu desestabilização.

Tabela 25: Comportamento apresentado pela formulação do creme à base da geoprópolis da *Melipona quadrifasciata anthidioides* após ciclo de gelo e degelo 6 dias, alternado 3 dias em refrigerador 8 ° C e 3 dias em temperatura ambiente 21°C.

Formulações	Classificação inicial	cor	odor	pH
1,5%	NS	NSA	NSA	5,76
2,5%	NS	NSA	NSA	5,66
5,0%	NS	NSA	NSA	5,71
controle	NS	NSA	NSA	6,45

Legenda: (NS) Normal, satisfatório; (NSA) Normal sem alteração, (S) Separado; (LA) Levemente alterada (TP), turvo ou precipitado; (IA) intensamente alterada / Fonte: autor

4.10.3 Estufa

Os resultados para tal avaliação indicam que as formulações propostas resistiram ao aumento da temperatura, uma vez que a coalescência não foi observada nas formulações do creme contendo o ativo da geoprópolis em (1,5%), (2,5%) e (5%). Após o ciclo, não houve mudança no padrão das formulações de características organolépticas como cor e odor (Tabela 26), diferente do que foi observado no estudo realizado por Bittencourt et al. (2014), que analisou o estresse térmico de uma emulsão contendo extrato de própolis e evidenciou instabilidade a 33° C, valor relativamente menor quando comparado a este estudo. De acordo com Idson (1993), é bem estabelecido que muitas emulsões podem ser perfeitamente estáveis a 40-45°C, mesmo não tolerando temperaturas em excesso de 55° C ou 60° C.

Tabela 26: Comportamento apresentado pela formulação do creme à base da geoprópolis da *Melipona quadrifasciata anthidioides* após ciclo em estufa 6 dias, alternado 3 dias em estufa a 45 ° C e 3 dias em temperatura ambiente 21°C.

Formulações	Classificação inicial	cor	odor	pH
1,5%	NS	NSA	NSA	5,77
2,5%	NS	NSA	NSA	5,69
5,0%	NS	NSA	NSA	5,75
controle	NS	NSA	NSA	6,42

Legenda: (NS) Normal, satisfatório; (NSA) Normal sem alteração, (S) Separado; (LA) Levemente alterada (TP), turvo ou precipitado; (IA) intensamente alterada / Fonte: autor

4.10.4 pH

Alterações de pH em uma formulação pode modificar as características físico-químicas do fármaco veiculado, influenciando propriedades como sua estabilidade, biodisponibilidade e biocompatibilidade, comprometendo a segurança e eficácia terapêutica da formulação (BUGNOTTO e ET.AL., 2006).

Foi avaliado o pH das formulações preparadas antes dos ciclos e após o gelo e degelo e após a estufa.

Após o ciclo de gelo e degelo, as formulações apresentaram uma pequena diminuição do seu pH, comparado ao pH medido antes desse teste.

Após 90 dias, as formulações praticamente não apresentaram variação do seu pH, em comparação ao pH obtido após 30 dias (tabela 27). Essa variação é não sigficativa ($P > 0,01$) assim como os valores de pH apresentados por (BUGNOTTO e ET.AL., 2006).

Tabela 27: Controle do pH com 24h, 30 dias e 90 dias.

Formulação com EEGP	24h (antes dos ciclos)	30 dias (gelo/degelo)	90 dias (estufa)
1,5%	5,89	5,76	5,77
2,5%	5,85	5,66	5,69
5%	5,83	5,71	5,75
controle	6,43	6,45	6,42

Fonte: Autor

O pH entre (6,0-5,0) mensurado nas formulações é compatível com o pH normal da pele em homens de ($4,6 \pm 0,3$) e mulheres ($5,1 \pm 0,4$). Estes resultados corroboram com os encontrados por Balata, Nahas e Radwan (2014) que relataram valores de pH (5,5-6,3) para um gel contendo própolis que sugere um baixo risco de irritação da pele.

Ainda de acordo o estudo de Bittencourt e colaboradores (2014) que avaliou o pH das bases Lanette®, Hostacerin® e Polawax®, após incorporação da própolis nas três bases. Os valores mensurados foram 6,3, 6,3 e 6,1, respectivamente e foi observado que não existiu variação no pH.

Uma outra pesquisa mostrou que uma formulação de gel contendo extrato da geoprópolis da *Melipona subnitida* apresentou valores de pH (4,6-4,8) (JÚNIOR, CABRERA, *et al.*, 2019). Assim como no trabalho de (BUGNOTTO e ET.AL., 2006) que não encontrou variação significativa nos valores de pH (3,79-4,17) em formulação contendo própolis, estes resultados não apresentaram variação no pH.

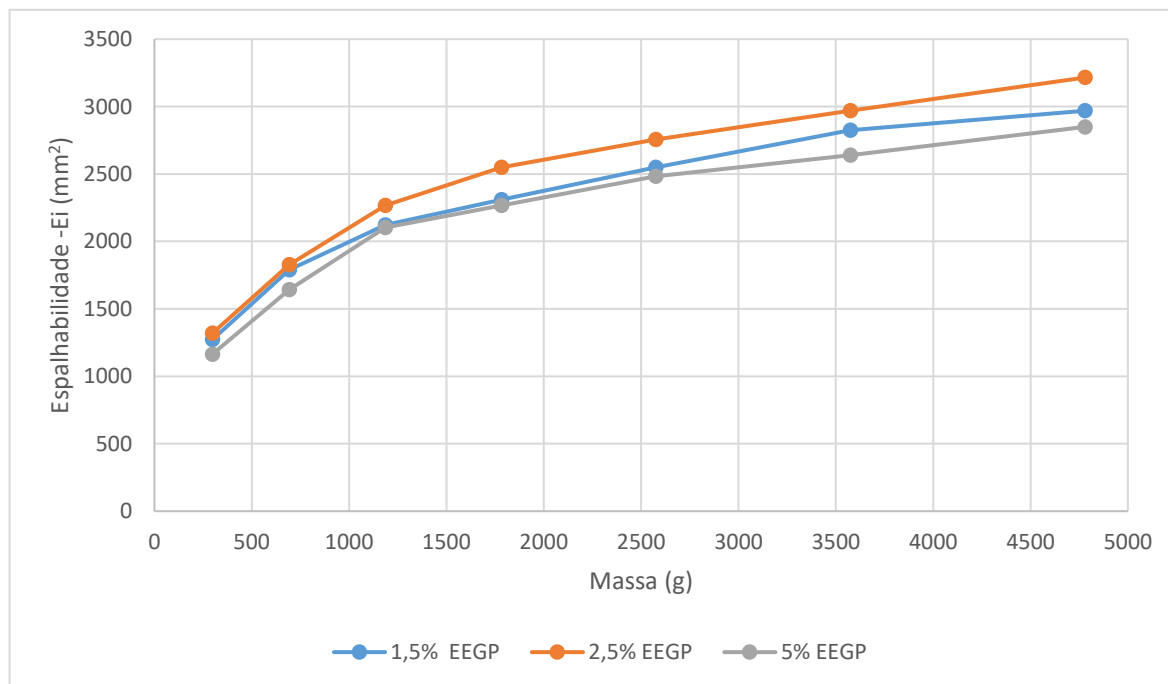
Em um estudo que testou a incorporação da própolis vermelha em cinco (5) bases cosméticas, sendo duas emulsões (creme Lanette® e creme Polawax®), um creme-gel (Hostacerin®) e dois géis (Aristoflex® e Natrosol®), foi

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® (BITTENCOURT, P., *et al.*, 2014).

4.10.5 Espalhabilidade

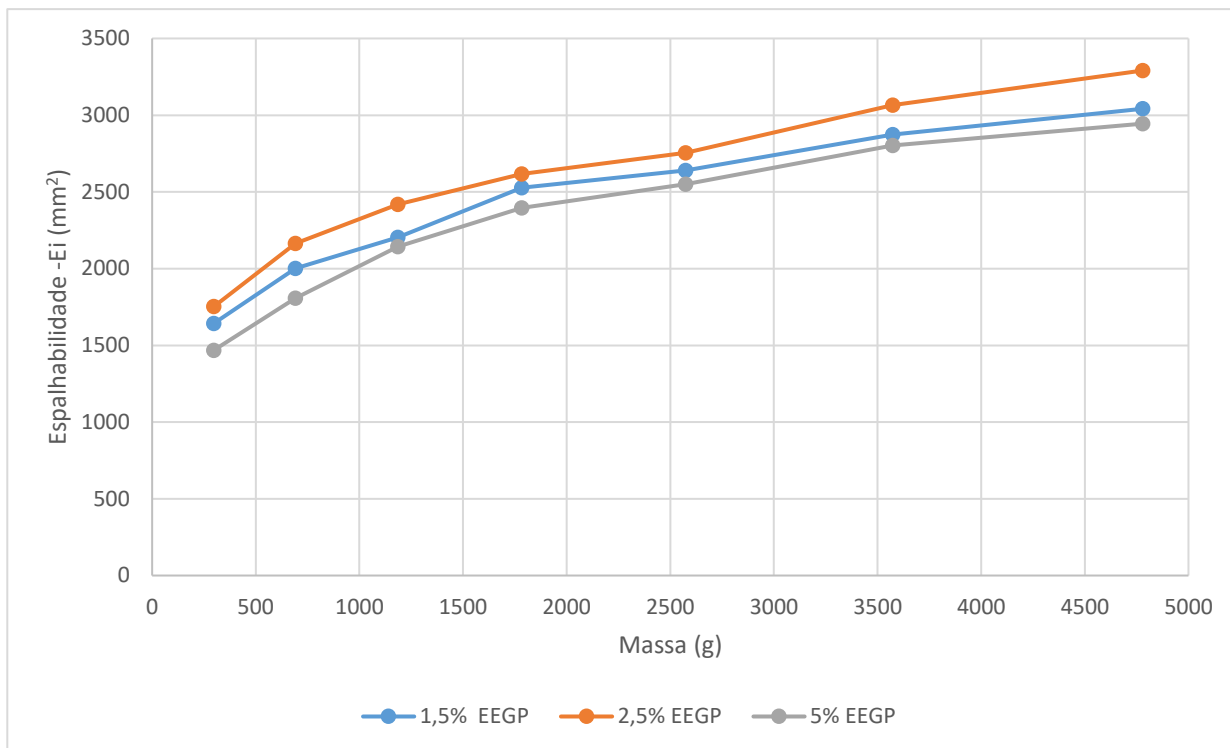
Ao lado da viscosidade, a determinação da espalhabilidade serve para avaliar alterações nas características reológicas da formulação durante o estudo. No caso de semissólidos de uso tópico, a quantificação desse parâmetro é importante para acompanhar modificações na capacidade que a formulação tem de se espalhar ou abranger determinada área, o que pode facilitar ou dificultar sua aplicação (BUGNOTTO e ET.AL., 2006). As formulações foram submetidas ao teste de espalhabilidade antes e após os ciclos gelo e degelo e estufa. Os resultados são expressos nos gráficos (30, 31 e 32).

Gráfico 30: Espalhabilidade (inicial) antes do gelo e degelo/estufa



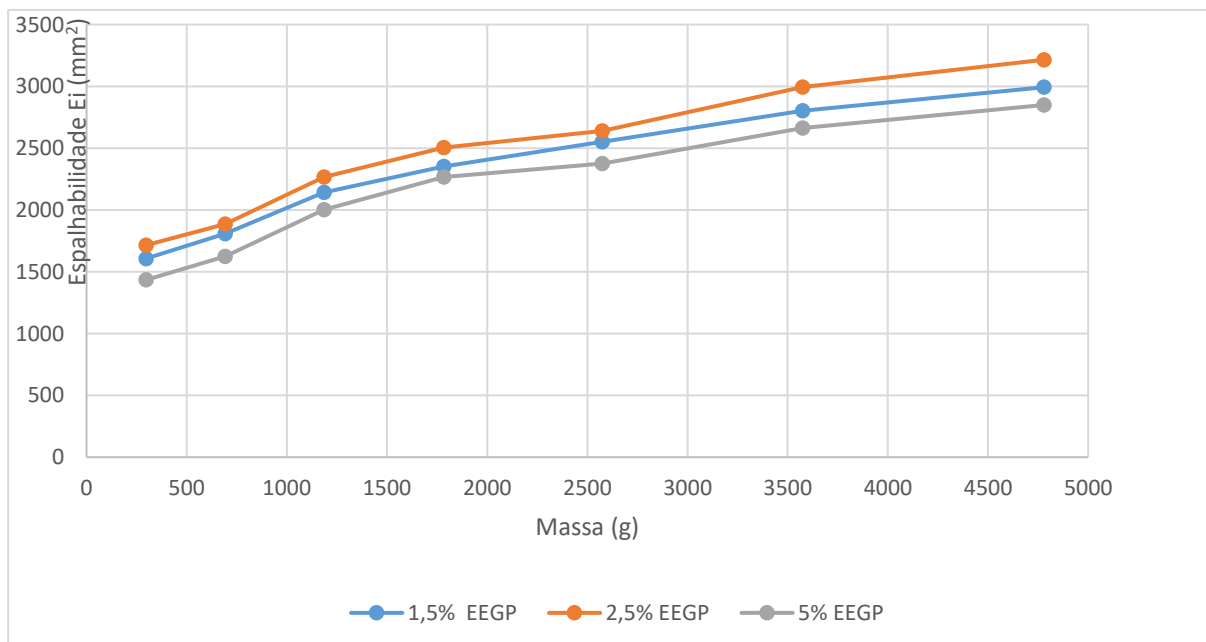
Fonte: autor

Gráfico 31: Espalhabilidade após gelo e degelo



Fonte: autor

Gráfico 32: Espalhabilidade após estufa



Fonte: autor

Em todos os testes, antes e depois dos ciclos gelo/degelo e estufa, a formulação do creme incorporado com (2,5%) do extrato de geoprópolis demonstrou ter maior espalhabilidade em relação as outras concentrações (1,5%) e (5%). Estes resultados evidenciam o EEGP como um potencial componente para o preparo de dermocosméticos, à medida que apresentou resultados positivos quanto a estabilidade das formulações preparadas.

Os dados deste trabalho corroboram com o estudo de Bugnotto (2006) que avaliou a estabilidade de uma formulação de gel cremoso incorporado de própolis a 3% (p/p) e apresentou boa estabilidade frente às condições de estresse testadas.

Análogo a este trabalho a incorporação de extrato de *Pereskia aculeata* Miller (Cactaceae) em uma base creme provocou aumento da elasticidade e do índice de espalhabilidade do produto, o que pode favorecer a aplicação do produto. Tanto o creme base quanto o produto final apresentaram-se estáveis no teste de centrifugação e no estresse térmico para temperaturas inferiores à 50° C. (LOPES., MAXIMINO e VILLANOVA, 2018).

Num estudo de espalhabilidade em 12 diferentes formulações contendo extrato de própolis de *Apis mellifera* os resultados obtidos na determinação da espalhabilidade de todas as emulsões preparadas foram consideradas fluidas, dentro do parâmetro de classificação adotada, onde um diâmetro menor ou igual a 5 cm corresponde a um creme semi-sólido, um diâmetro entre 5 e 7 cm corresponde a um creme semi-fluido e diâmetro maior que 7 cm, a um creme fluido (FIORATTI., 2005).

Ainda Neto (2015), concluiu que uma formulação de gel contendo ácidos triterpênicos apresenta a mesma espalhabilidade quando comparada a uma preparação de gel contendo lipossomas. O autor ainda observou que a incorporação de lipossomas na formulação em destaque não influencia nas suas características de espalhabilidade.

Também Ahmed et al (2011), verificaram o efeito de um creme formulado com extrato de própolis egípcio em feridas provocadas por diabetes e em

queimaduras. E findou que a própolis sozinha ou em combinação com a Dermazina podem ser utilizadas em um creme com características antibacterianas para o tratamento de queimaduras e feridas provocadas pela diabetes. Al Hamadaui (2010), relatou que uma mistura preparada pomada de própolis e cominho preto manifesta-se como de alta eficácia no tratamento de feridas.

O estudo de Carvalho (2014), verificou que formulações elaboradas com incorporação da própolis vermelha em creme Lanette não apresentaram alterações de cor, e odor. Ainda foram observados valores de Fator de Proteção Solar (FPS) para o creme. O autor concluiu que diante da riqueza de compostos antioxidantes presentes na própolis vermelha, este produto natural venha ser capaz de funcionar como um potencial adjuvante em formulações cosméticas.

Segundo Júnior et al. (2019), a formulação em gel à base do extrato da geoprópolis de jandaira se mostrou rica em bioativos como flavonoides, além de apresentar uma alta atividade antifúngica e pode ser utilizada como terapêutica alternativa ao tratamento adjuvante da candidíase.

Um estudo de Silva (2016) mostrou um efeito benéfico do uso tópico do creme de geoprópolis da abelha *Plebeia aff. flavocincta*, à medida que a avaliação histológica das feridas cirúrgicas verificou uma redução significativa da densidade de células polimorfonucleares, aumento significativo da contagem dos fibroblastos e fibras colágenas nos animais do grupo experimental. O autor concluiu que o creme à base da geoprópolis apresentou influência positiva na cicatrização de feridas cutâneas experimentais.

A pesquisa de Berreta et al (2012) mostrou a diminuição do recrutamento de células inflamatórias e aumento da produção de colágeno em feridas cutâneas experimentais em ratos tratados com gel preparado à base da própolis verde.

Outro estudo realizado por Abreu et al (2012) demonstraram que a aplicação tópica do extrato de própolis a 30% foi capaz de promover a fibroplasia, a reepitelização e aceleração da cicatrização, quando comparada a um grupo controle.

Kalil et al (2019) demonstraram que o tratamento pós-cirúrgico da Linfadenite caseosa em ovelhas através da formulação de uma pomada à base de própolis verde (20%) é melhor, comparado ao tratamento com aplicação de uma tintura de iodo a 10%. Os resultados foram demonstrados através da redução de uma semana no processo de cicatrização. Segundo os autores a aplicação da pomada de própolis verde não induziu nenhum efeito colateral observável quando os dados bioquímicos de laboratório e os animais tratados foram avaliados.

Um estudo realizado por (SILVA, 2017) avaliou a influência da pomada de própolis em concentração de 30% na cicatrização de diferentes tipos de úlceras, e revelou eficácia da terapêutica alternativa, com baixo custo, através de um produto viável, com facilidade na troca da cobertura, e curto tempo médio de cicatrização (45 dias) com trocas diárias dos curativos.

Outra pesquisa que avaliou a evolução de úlceras crônicas utilizando a terapêutica tópica com a própolis, onde 20 pessoas com feridas crônicas foram tratadas e tiveram média de cicatrização em 13,1 semanas, o autor concluiu que a utilização da pomada de própolis foi de fácil acesso e baixo custo, além de ser eficiente na cicatrização de feridas (SANTOS, 2007).b

Segundo (ARVOUET-GRAND A, 1994.), esta propriedade cicatrizante da própolis, assim como várias outras propriedades biológicas, está relacionada com flavonoides e ácidos fenólicos. Em pesquisa comparada a propriedade cicatrizante de um creme de própolis com um de sulfadiazina de prata, foi demonstrado que os ferimentos tratados com própolis apresentaram menos inflamação e mais rápida cicatrização do que aqueles tratados com sulfadiazina de prata (GREGORY SR, 2002).

Os resultados obtidos nesta pesquisa evidenciaram que a geoprópolis da abelha *Melipona q. anthidioides* se mostrou promissora sob o ponto de vista da composição química, atividade biológica e estabilidade de uma formulação semissólida. Entretanto, vale salientar que os testes de atividade antioxidante e de teores de fenóis e flavonoides totais, comumente avaliados em pesquisa com geoprópolis, estão intensamente relacionados com a flora de cada região visitada

pelas abelhas e, portanto, pode ser influenciado por fatores climáticos, tais como temperatura, intensidade de luz e pluviosidade (CARDOZO, 2015).

Na zona ecótono da Bahia, local de coleta das amostras utilizadas como matéria-prima na formulação semissólida (creme) apresentada neste trabalho, existe uma transição de bioma variando da Mata Atlântica para Caatinga, esta observação permite concluir a existência de uma maior disponibilidade de recursos genéticos vegetais para estas abelhas. Entretanto, a sazonalidade da vegetação envolvida nestes 2 biomas pode dificultar uma padronização de extratos desta geopólis para uso medicinal.

Desta maneira, são imprescindíveis estudos sazonais sobre a composição química e atividades biológicas da geoprópolis produzida por meliponíneos nos diferentes biomas em questão, a fim de buscar uma padronização para o extrato da geoprópolis das melíponas e assim poder estabelecer uma formulação com características próprias que agregue valor a este produto das abelhas sem ferrão.

5 CONCLUSÕES

Na prospecção de patentes foi possível verificar que atualmente há poucos estudos de pesquisas e patentes relacionadas aos produtos das abelhas sem ferrão. Em relação à geoprópolis de *Melipona quadrifasciata anthidioides* nenhum requerimento de patente foi encontrado.

Os resultados da microbiota da geoprópolis da *Melipona quadrifasciata anthidioides* figuram como referência para futuros trabalhos de qualidade da matéria prima desta natureza. Além de ajudar na compreensão da relação simbiótica das abelhas com estes microorganismos.

A validação do método analítico para quantificação dos multielementos na amostra da geoprópolis bruta analisada mostrou que o método se apresenta linear, exato e preciso proporcionando resultados confiáveis. O teor de carbono residual mostrou uma boa eficiência na digestão da matéria orgânica das amostras usando os métodos de preparação propostos.

A geoprópolis da *Melipona quadrifasciata anthidioides* mostrou-se uma matéria-prima viável, uma vez que os extratos obtidos apresentaram um rendimento acima da média comparado com outros estudos apresentados na literatura científica, além de elevado potencial antioxidante. Estes compostos antioxidantes podem ser incorporados a diversas formulações farmacêuticas para constituírem ativos na prevenção e tratamento de diversas enfermidades.

As condições cromatográficas do método utilizadas para a obtenção dos perfis químicos do extrato da geoprópolis se mostraram eficazes, compondo uma boa separação e resolução dos picos. Os comprimentos de onda responsáveis pelas separações nos extratos foram entre 200 e 400nm, comprimentos de onda típicos dos espectros de flavonoides. Entretanto faz-se necessário a validação do método para quantificação das substâncias específicas identificadas nesse extrato.

Na caracterização dos extratos desta geoprópolis foram encontrados valores elevados de compostos fenólicos totais, com destaque para a identificação dos flavonoides ácido gálico, naringenina, kampferol e kaempferide e exibiu uma alta capacidade antioxidante, além de atividade antimicrobiana nos testes.

A geoprópolis da *Melipona quadrifasciata anthidioides* aqui estudada apresentou altos teores de macro e microelementos especialmente cálcio (Ca), potássio (K), magnésio (Mg), ferro (Fe) e alumínio (Al) respectivamente.

O extrato etanólico da geoprópolis da *Melipona quadrifasciata anthidioides* avaliado apresentou atividade microbiológica importante na inibição de bactéria gram positiva e gram negativa que apontam várias possibilidades para o desenvolvimento tecnológico de produtos.

A caracterização físico-química e os resultados da microbiota obtidos neste estudo apresentam importância, pois contribuem para o estabelecimento de parâmetros na elaboração de uma legislação específica, como Procedimentos de Identidade e Qualidade (PIQ) da geoprópolis de produtos das abelhas nativas brasileiras (melíponas).

Os estudos correlacionando a composição química com as atividades biológicas, da geoprópolis são necessários com a finalidade de identificar o tipo de geoprópolis com a sua aplicação terapêutica, além de padronizar quimicamente o produto com o objetivo de garantir sua qualidade, eficácia e segurança.

Apesar dos resultados promissores da formulação (PLO-EEGP 5%), como a possibilidade da encapsulação contendo o ativo com atividade antioxidante e do pH mensurado na formulação ser compatível com o pH normal da pele de homens e mulheres, o preparado (PLO-EEGP 5%) apresentou instabilidade na formulação. Testes de armazenamento da formulação em diferentes temperaturas devem ser realizados, assim como novas técnicas de preparo de microencapsulados devem ser testados com a geoprópolis.

Além disso, métodos como: espalhamento de luz dinâmico (DLS), as medições do potencial zeta, taxa de eficiência de encapsulação (EE), espalhamento de raios-x a baixo ângulo (SAXS), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a microscopia de fluorescência são sugeridos para a avaliação da qualidade e padronização destes microencapsulados.

O creme aniônico presente no Formulário Nacional caracterizou-se como um veículo com potencial para incorporação de ativos da geoprópolis da *Melipona quadrifasciata anthidioides*. A formulação preparada apresentou boa estabilidade física frente aos testes de envelhecimento acelerado mediante as metodologias utilizadas. Recomenda-se a realização de testes de viscosidade e reologia além dos testes de crescimento microbiano, e de atividades antioxidante e antimicrobiana com intuito de enriquecer as características da formulação.

Dessa forma, o extrato da geoprópolis da *Melipona quadrifasciata anthidioides* coletado na região semiárida do Estado da Bahia apresenta-se como uma matéria prima com potencial para fornecer compostos biotivos com propriedades farmacológicas. Assim, apresenta-se como um componente promissor para o preparo de dermocosméticos à medida que apresentou resultados positivos quanto a estabilidade das formulações. E dessa maneira pode agregar valor aos produtos das abelhas sem ferrão.

Embora comprovações científicas evidenciem segurança e eficácia do uso da própolis para a saúde humana, há necessidade de investigações sobre a geoprópolis e ensaios clínicos sobre as diversas propriedades biológicas desses produtos.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A formulação semissólida do tipo creme preparada à base da geoprópolis da *Melipona q. anthidoides* expôs estabilidade em relação as condições de estresse testadas, não apresentou sinais de alteração físico-química. Sua capacidade de incorporação e aquiescência do extrato hidroalcoólico da geoprópolis foi executada com sucesso, conservou inalteradas suas características após os testes de estabilidade acelerada. Assim a formulação desenvolvida agrega valor aos produtos destas abelhas sem ferrão.

O trabalho aqui realizado colabora com outros estudos relacionados com essa temática, ao mesmo tempo em que situa inovação, perspectivas e direciona novos estudos nessa área. Percebemos uma defasagem de pesquisas com elaboração de formulações semissólida contendo o extrato da geoprópolis como ativo principal.

Esta pesquisa aponta a perspectiva de prosseguir com os estudos dos ativos da geoprópolis da *Melipona quadrifasciata anthidoides*, suas características físico-químicas e capacidade de atuar como potencial matéria prima na incorporação de preparações farmacêuticas.

Perspectivas:

- Validação do método utilizado no HPLC e quantificação dos compostos identificados.
- Identificação de outros compostos separados pela CLAE, presentes no extrato etanólico da geoprópolis.
- Estudos de outras atividades biológicas do extrato da geoprópolis: antitumoral, anti-inflamatória, imunomoduladora, antiviral (arboviroses ZIKV,

CHIKV) além de testes contra o coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2) responsável pela COVID-19.

- Testes do extrato contra outros microorganismos patogênicos.
- Estudo de possível sinergismo do extrato da geoprópolis com diversos antibióticos diferentes.
- Desenvolvimento de outras formas farmacêuticas como: pomadas, unguentos, lipossomas, microencapsulados e nanoencapsulados além de estudos de estabilidade com elas.
- Padronização da formulação do organogel (PLO) e realização de testes de caracterização específicos.
- Testes da atividade antioxidante e antimicrobiana ainda serão realizados no creme formulado nesta pesquisa com intuito de avaliar a estabilidade destas propriedades dos ativos na formulação pronta e uma ação cicatrizante.
- Padronização da formulação do creme, testes de crescimento microbiano e uma possível realização de testes *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- TSVETKOVA, K.; I., Y. S. V. B. R. C. A. S. P. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 64, pp. 235–240, 1999. View at Publisher .
- ABDELHADY, N.; ABDALLAH, G. HPLC/MS/MS Study of Phenolic Compounds of *Leucaena leucocephala* Legumes Monitored with Their in vitro Antihyperglycemic Activity. **European Journal of Medicinal Plants**, v. 17, n. 4, p. 1–9, 2016.
- ABBASPOUR, N.; HURRELL, R.; KELISHADI, R. Review on iron and its importance for human health. **J Res Med Sci**, p. 164–174, 2014.
- ABREU, A. M. et al. Effect of topical application of different substances on fibroplasia in cutaneous surgical wounds. **ISRN Dermatol.**, p. 1-5, 2012.
- AGATA, N.; OHTA, M.; YOKOYAMA, K. Production of *Bacillus cereus* emetic toxin (cereulide) in various foods. **Int J Food Microbiol**, p. 23-7, 2002.
- AHMED ET, A.-S. O. . O. A. Egyptian propolis on induced burn woThe influence of fund healing in diabetic rats;antibacterial mechanism.. **Sci J Med Clin Trails**, p. 2317, 8 pages, 2011.
- AHU., A.-H. The use of propolis and black cummin in treatment of some wounds and burn infections. **QMJ** , p. 6:210–22., 2010.
- AMARASINGHE, N. R. et al. Chemical constituents of the fruits of *Artocarpus altilis*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 36, n. 4, p. 323–325, 2008.
- AREF, H. L. et al. In vitro antimicrobial activity of four *Ficus carica* latex fractions against resistant human pathogens (antimicrobial activity of *Ficus carica* latex). **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 23, n. 1, p. 53–58, 2010.
- ASSUNÇÃO, A. C. M. Atividade antioxidante da casca da pêra abacate (*Persea americana*) e identificação dos seus compostos. 2016.
- AIDAR, D. S. **A mandaçaia**: biologia de abelhas, manejo e multiplicação artificial de colônias de *Melipona quadrifasciata*. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1996.
- AIDAR, D. S.; ROSSINE, J. F. Transporte de colônias de meliponíneos para curtas distâncias e sua relação com a perda de campeiras (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Mensagem Doce**, 2002.
- ALENCAR, S. M. D. et al. Composição de *Baccharis dracunculifolia*, fonte botânica das própolis dos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Ciência Rural**, p. 909-915, 2005.
- ALI, M. et al. Nanovaccine for leishmaniasis: preparation of chitosan nanoparticles containing *Leishmania* superoxide dismutase and evaluation of its immunogenicity in BALB/c mice. **Int J Nanomed**, p. 835–842, 2011.
- ALSAAB, H. . B. S. P. . B. D. . C. P. . A. K. . & B. S. H. Organogels in Drug Delivery: A Special Emphasis on Pluronic Lecithin Organogels.. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, , p. 19(2), 252-273, , 2016.
- ALVES, C. Q. E. A. Avaliação da atividade antioxidante dos flavonoides. **Diálogos e Ciência** , p. 12, 2007.

AMARAL, M. P. H. et al. Determinação do teor de cumarina no xarope de guaco armazenado em diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, p. 607-611, 2009.

AMPARO, K. K. D. S. et al. Estudo de caso utilizando mapeamento de prospecção tecnológica como principal ferramenta de busca científica. **Perspectivas em Ciência da Informação**, p. 195-209, 2012.

ANDRADE, V. M. **Obtenção De Gel Plo Contendo Rutina Para Aplicação Transdérmica: Caracterização, Estabilidade E Atividade Antioxidante**. São Cristóvão-SE : Programa De Pós-Graduação Em Ciências Farmacêuticas Universidade Federal De Sergipe - Ufs , 2017.

ANDRADE. et al. Development and characterization of microencapsules containing spray dried powder obtained from Brazilian brown, green and red propolis. **Food Research International**, p. 109 278–287, 2018.

ANGELO, P. N.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Rev Inst Adolfo Lutz**, p. 1-9, 2007.

ANSARI, S. A..In: BAREL, A. O.; PAYE, M.; MAIBACH, H. I. Handbook of cosmetic science and technology. **3rd. ed. New York: Informa Heathcare**, p. cap 21, 2009.

ANSEL, H. C.; ALLEN, L. V.; POPOVICH, N. G. **Farmacotécnica: formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. Philadelphia: Lippincott, 1999.

ANVISA. **Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)**. Brasília: ANVISA, 2001.

ANVISA. **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos / Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Brasília: ANVISA, 2004.

ANVISA. Resolução Da Diretoria Colegiada - RDC Nº 67, de 8 de outubro de 2007. In: **BRASIL Dispõe sobre Boas Práticas de Manipulação de Preparações Magistrais**. [S.I.], 2007.

ARAGÃO, A.; ET AL. Naringenina Nanoencapsulada Em Lipossoma Produz Efeito Sobre A Contração De Feridas Cutâneas Abertas Em Ratos. **X SIMPÓSIO BRASILEIRO DE FARMACOGNOSIA**, 2015.

ARAUJO, M. J. A. **Geoprópolis de Melipona fasciculata Smith: Ações citotóxicas, imunomoduladoras, antibacteriana e antiúngica**. Botucatu: Programa de pós graduação em patologia, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2013.

ARREDONDO, M.; NÚÑEZ, M. T. Iron and copper metabolismo. **Mol. Aspects Med.**, p. 313–327, 2005.

ARVOUET-GRAND A, V. B. P. A. L. P. Standardization of propolis extract and identification of principal constituents. **J Pharm Belg** , p. 49: 462-468., 1994..

AUGUST, P. M. **Avaliação do efeito da suplementação com naringenina associada ao exercício físico materno sobre a homeostase redox e o metabolismo energético emencéfalo de ratos Wistar**. Porto Alegre: Dissertação Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande Sul, 2016.

BARBOSA, D. DE A. **Avaliação Fitoquímica e Farmacológica de Genipa americana L.**

(RUBIACEAE). Dissertação de Mestrado, Rio de Janeiro, p. 115, 2008.

BALAGURU, S.; RAMYA DEVI, D.; & VEDHA HARI, B. N. Organogel: An Ideal Drug Delivery Carrier for Non Steroidal Anti-Inflammatory Drugs through Topical Route.. **International Journal of Pharmaceutical Quality Assurance** , p. 6(2) 2-37, 2014.

BALATA, G.; NAHAS, H. M.; RADWAN, S. Propolis organogel as a novel topical delivery system for treating wounds. **Drug delivery**, p. 55-61, 2014.

BANKOVA V, C. S. M. M. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, 2000. 3-15.

BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **Journal of Ethnopharmacology**, p. 114-117, 2005.

BANKOVA, V.; CASTRO, S. L.; MARCUCCI, M. C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, p. 3-15, 2000.

BANKOVA.; V., R. C. C. M. A. S. P. "Constituents of Brazilian geopropolis," Zeitschrift fur Naturforschung C. **Journal of Biosciences**, p. vol. 53c, pp. 402–406, 1998.

BARBOSA, R. et al. Multiple Rounds of Artificial Selection Promote Microbe Secondary Domestication-The Case of Cachaça Yeasts. **Genome Biol. Evol.**, p. 1939–1955, 2018.

BARBOSA, V. D. F. **Caracterização do perfil da ação do ácido gálico e seus derivados sobre processos oxidativos in vitro e ex vivo**. São Paulo: Dissertação (mestrado)- Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2010.

BARCELOUX, D. G.; BARCELOUX, D. Vanadium. **J. Toxicol. Clin. Toxicol.**, p. 265–278, 1999.

BARRA, G. V. et al. Anti-inflammatory activity and phenolic profile of propolis from two locations in Región Metropolitana de Santiago, Chile. **Journal of Ethnopharmacology**, p. 37-44, 2015.

BARTH, O. M. . L. C. F. P. Palynological analysis of Brazilian geoprópolis sediments. **Grana**, p. 121-127, 2003.

BASU, A. et al. A review on sources, toxicity and remediation technologies for removing arsenic from drinking water. **Res. Chem. Intermed.**, p. 447–485, 2014.

BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M. B.; MAGALHÃES, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: estado da arte.. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas [Online]**. , p. vol. 43, n. 2, pág. 167-179., 2007.

BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M. B.; SANTOS, S. N. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, p. vol. 43, n. 2, abr./jun, 2007.

BATISTA, M. C. A. et al. Chemical composition and antioxidant activity of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* (Meliponinae) in flooded fields and cerrado areas of Maranhão State, northeastern Brazil. **Acta Amazonica**, p. VOL. 46(3) 315 - 322, 2016.

BENSON, N. U. Lead, nickel, vanadium, cobalt, copper and manganese distributions in intensely cultivated floodplain ultisol of cross River. **Int. J. Soil Sci.**, p. 140–145, 2006.

BERNAL, M. G.; ET AL. Actividad in vitro del Propóleos frente a Patógenos Bacterianos aislados de Infecciones Humanas. **Latin American Journal of Pharmacy**, p. 100-2, 2007.

BERRETTA, A. et al. Propolis standardized extract (EPP-AF®), an innovative chemically and biologically reproducible pharmaceutical compound for treating wounds. **Int. J. Biol. Sci.**, p. 512-521, 2012.

BEZERRA, B. P. **Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação de teor de ácido gálico e catequina no fitoterápico sanativo por cromatografia líquida de alta eficiência**. Natal – RN.: Dissertação (Mestrado) em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2012..

BEZERRA.; S.S. **Obtenção, Caracterização e Avaliação Microbiológica De Uma Nova Forma Farmacêutica Contendo Hidroquinona**. RECIFE: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2003.

BISPO, J. DE S. et al. Size and vigor of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan seeds harvested in Caatinga areas. **Journal of Seed Science**, v. 39, n. 4, p. 363–373, 2017.

BILSKI, J. et al. Leaching of selected trace elements from plant growth media composed of coal fly ash (FA), and of FA amended with sphagnum peat moss and soil. **Res. J. Chem. Environ Sci.**, p. 7-18, 2013.

BITTENCOURT et al. Avaliação da atividade antifúngica de formulações semissólidas contendo extrato hidroalcoólico de própolis vermelha. **Scientia Plena**, p. VOL. 10, NUM. 10, 2014.

BITTENCOURT.; OLIVEIRA, F. **Desenvolvimento E Avaliação Da Atividade Antimicrobiana Contra Candida Albicans De Formulações Semissólidas Contendo Própolis Vermelha**. Aracajú: Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação em Saúde e Ambiente. Universidade Tiradentes, 2008.

BOAS, J. V. **Manual Tecnológico: Mel de Abelhas sem Ferrão**. Brasília: ISPN, 2012.

BONAMIGO, T. C. J. F. A. T. M. . B. J. B. P. . C. C. A. L. G. E. J. P. . S. K. D. P. . D. S. E. L. Antioxidant, Cytotoxic, and Toxic Activities of Propolis from Two Native Bees in Brazil: *Scaptotrigona depilis* and *Melipona quadrifasciata anthidioides*. **HINDAWI**, 2017.

BONAMIGO, T.; AL., E. Antioxidant, Cytotoxic, and Toxic Activities of Propolis from Two Native Bees in Brazil: *Scaptotrigona depilis* and *Melipona quadrifasciata anthidioides*. **Hindawi Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, p. 12, 2017.

BONSUCESSO, J. S.; ET.AL. Metals in geopropolis from beehive of *Melipona scutellaris* in urban environments. **Science of the Total Environment**, p. 687-694, 2018.

BORELLA, J. C.; PEREIRA, L. H. T. R. Produção e avaliação comparativa de preços de produtos do Laboratório de Manipulação Farmacêutica - Ribeirão Preto – SP: experiência relacionada à Assistência Farmacêutica no SUS. **Caderno Saúde Coletiva**, p. 210-216, 2017.

BOROWSKY, L. M. et al. Sensibilidade e resistência de amostras de *Salmonella Typhimurium* isoladas de suínos abatidos no Rio Grande do Sul/Brasil frente aos desinfetantes químicos quaternário de amônio iodofor. **Ciência Rural**, p. 1474-1479, 2006.

- BORRELLI, F. et al. Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. **Fitoterapia**, p. 53-63, 2002.
- BONFANTI, G. et al. Delta-ALA-D inhibitory potential and protective action of *Syzygium jambos* and *Solanum guaraniticum* leaf extracts on oxidatively stressed erythrocytes. **Redox Report**, v. 19, n. 5, p. 206–213, 2014.
- BORGES, I. V. et al. Identification of the antimicrobial fraction of *Mimosa tenuiflora* extract. **Comunicata Scientiae**, v. 8, n. 1, p. 155–164, 2017.
- BOZZUTO, G.; MOLINARI, A. Liposomes as nanomedical devices.. **International Journal of Nanomedicine**, p. v. 10, p. 975–999, 2 fev. , 2015.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. L. W. T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food science and Technology**, p. v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.
- BRASIL. **Instrução Normativa nº 62 de 26 de agosto de 2003 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**. Brasília: MAPA, 2003.
- BRASIL. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. Brasília: Gerência Geral de cosméticos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)., 2004.
- BRASIL. **Resolução 222, de 29 de julho de 2005. Dispõem sobre o Formulário**. Brasília: Diário Oficial da União, 2005.
- BRASIL. **Formulário nacional da farmacopeia brasileira**. BRASÍLIA: MINISTÉRIO DA SAÚDE/ ANVISA, 2012.
- BRASIL, C. N. D. M. A. RESOLUÇÃO Nº 346, DE 16 AGOSTO DE 2004. Disciplina A Utilização De Abelhas Silvestres Nativas, Bem Como A Implantação De Meliponários. **Diário Oficial da União**, p. Seção 1,p.70, 17 agosto 2004.
- BRASILEIRO, J. S. L. **Microencapsulação de compostos bioativos: inovação em diferentes áreas**. Porto: Dissertação (Mestrado em Ciências farmacêuticas)-Universidade Fernando Pessoa,2011. 71 pág. , 2011.
- BUGNOTTO, C.; ET.AL. Estudo de estabilidade de formulação tópica contendo própolis. **Disc Scientia. Série: Ciências da saúde**, p. 1-12, 2006.
- BURDA, G. A.; ORLESZEK, W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. **J. Food Chem.**, 2001. 2774- 2779.
- BUSCH, V. M. . A. P.-G. . N. S. . P. R. S. A. N. P. U. Propolis encapsulation by spray drying: Characterization and stability. **Food Science and Technology**, p. 227e235 75, 2017.
- BUSH, V. M. et al. Propolis encapsulation by spray drying: Characterization and stability. **Food Science and Technology**, 75, 2017. 227-235.
- CABRAL, B. **Caracterização dos marcadores químicos e avaliação de atividades biológicas do extrato de *Spondias mombim***. Natal-RN: Universidade Federal do Rio Grande do Norte, v. Mestrado em Ciências Farmacêuticas, 2014. 95 p.
- CABRAL, I. S. R. L. O. T. L. C. . P. A. . B. R. M. N. Composição Fenólica, Atividade Antibacteriana E Antioxidante Da Própolis Vermelha. **Química Nova**, p. 1523-1527, 2009.

- CAMARGO, J. M. F. et al. Notas prévias sobre a bionomia de *Ptilotrigona lurida* (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae): associação de leveduras em pólen estocado. **Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi, sér. Zool.** **8**, p. 391-395, 1992.
- CANTARELLI, M. A. et al. Trace mineral content of Argentinean raw propolis by neutron activation analysis (NAA): Assessment of geographical provenance by chemometrics. **Food Sci. Technol.**, p. 256-, 2011.
- CAO, X. P. . C. Y. F. . Z. J. L. . Y. M. M. . W. K. . H. F. L. . Mechanisms underlying the wound healing potential of propolis based on its in vitro antioxidant activity. **Phytomedicine**, p. 34, 76–84, 2017.
- CARDOZO, D. V. E. A. Variabilidade química de geoprópolis produzida pelas abelhas sem ferrão Jataí, Mandaçaia e Mandurí. **Revista Virtual de Química**, p. 2456-2474, 2015.
- CARNEIRO, L. C. Avaliação de *Escherichia coli* em manipuladores de alimentos da cidade de Morrinhos-GO. **Vita et Sanitas**, 2008.
- CARVALHO, L. P. **Nanotecnologia Aplicada À Dermocosmética**. LISBOA: Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias. Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde, 2018.
- CARVALHO, S. R. L.; VILAS-BOAS, G. S.; FADIGAS, F. S. Estimate of the concentration of heavy metals in soils of tables of Bahia's Reconcavo. **Cad. Geoc**, p. 1-11, 2010.
- CARVALHO.; F. M. A., A. V. F. A. J. C. C. C. C. M. R. L. C. D. A. Desenvolvimento de uma nova formulação a base de própolis vermelha como medida fotoprotetora. **Semana de pesquisa da UNIT**, 2014.
- CASTALDO, S.; CAPASSO, F. Propolis na old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, 2002. 1- 6.
- CASTRO, M. L. et al. Castro, Myrella Léssio. **Química Nova**, p. 1512 - 1516, 2007.
- CASTRO, M. T. Food Safety Brazil. **Food Safety Brazil**, 31 Outubro 2018. Disponível em: <<https://foodsafetybrazil.org/coliformes-totais-e-coliformes-termotolerantes-voce-sabe-diferenca/>>.
- CHALLINOR, V. L.; BODE, H. B. Bioactive natural products from novel microbial sources. **Annals of the New York Academy of Sciences**, p. 82-97, 2015.
- CHAVES, V. C. **Caracterização Química De Frutos Vermelhos Cultivados No Sul Do Brasil E Avaliação Farmacológica De Extrato De Rubus Sp. Em Modelo Animal De Mania E Neuroinflamação**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina Centro de Ciências Biológicas, 2017.
- CHAWLA, S. J.; M; AMIJII, M. Biodegradable poly(o-caprolactone nanoparticles for tumor targeted delivery of tamoxifen. **Int J Pharm**, p. 127–138, 2002.
- CHEN, Q.; SCHÖNHERR, H.; VANCSO, G. J. Mechanical properties of block copolymer vesicle membranes by atomic force microscopy. **Soft Matter**, p. 24, 2009.
- CHIARI, B. G. et al. Assessment of the chemical profile, polyphenol content and antioxidant activity in extracts of *Psidium Guajava* L. fruits. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. SUPPL. 5, p. 331–336, 2012.

- CHORILI, M.; BRIZANTE, A. C. R. C. A.; SALGADO, H. R. N. Aspectos gerais em sistemas transdérmicos de liberação de fármacos. **Rev. Bras. Farm.**, p. 7 - 13, 2007.
- CHOWDHURY, S. M. et al. Cell specific cytotoxicity and uptake of graphene nanoribbons. **Biomaterials**, p. 282–293, 2013.
- CISILOTTO, J. et al. Cytotoxicity mechanisms in melanoma cells and UPLC-QTOF/MS 2 chemical characterization of two Brazilian stingless bee propolis: the uncommon presence of piperidinic alkaloids. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, p. DOI: 10.1016/j.jpba.2017.11.038, 2017.
- COIMBRA, E. Q. **Compostos Fenólicos Totais, Flavonoides E Atividade Antioxidante De Extratos Metanólicos De Senna rugosa**. Patos de Minas-MG: Universidade Federal de Uberlândia, 2019.
- CORMICK, G.; BELIZÁN, J. M. Calcium Intake and Health. **Nutrients**, p. 1606, 2019.
- CORTOPASSI-LAURINO, M. -F. V. L. D. W. . D. A. . H. T. . A. I.; NOGUEIRA NETO, P. Global meliponiculture: challenges and opportunities. **Apidologie**, p. 275-292, 2006.
- COSTA, D. M.; LAMARÃO, C. V.; YAMAGUCHI, K. K. D. L. Caracterização fitoquímica de semente de cupuí (*Theobroma subincanum*) e cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) para uso biotecnológico.. **Revista Ensino, Saúde e Biotecnologia da Amazônia**, v. v. 1, p. p 1, 4, jun 2019.
- COSTA, L. M. et al. Focused microwave-assisted acid digestion of oils: an evaluation of the residual carbon content. **Spectrochimica Acta**, p. 1981-1985, 2001.
- COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoides: Potenciais Agentes Terapêuticos para o Processo Inflamatório. **REVISTA VIRTUAL DE QUIMICA**, p. 241-256, 2009.
- CUNHA, I. et al. actors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts. **J Brazil Chem Soc**, p. 964-970, 2004.
- CUNHA, M. et al. Padronização de extrativos de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith (túba). **Cad Pesq. UFMA**, p. 31-38, 2009.
- CUNHA, M. G. . R. P. L.; FRANCHIN, M. E. A. Antiproliferative constituents of geopropolis from the bee *Melipona scutellaris*. **Planta medica**, v. v. 82, n. n. 3, p. p. 190, 2016.
- CUNHA, T. N.; SOARES, I. C.; GASPARI, E. N. Em busca de lipossomas inteligentes para administração de drogas para a tuberculose.. **Boletim Epidemiológico Paulista [Online]**, 2007.
- CUSHNIE, T. . L. A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, p. 343 – 356., 2005.
- CVEK, J.; ET.AL. The content of essential and toxic elements in Croatian propolis samples and their tinctures. **Journal of Apicultural Research**, 2008.
- D'AMORE, J. J.; AL-ABED, S. R.; SCHECKEL, K. G. A. R. J. A. Methods for speciation of metals in soils: a review. **J. Environ. Qual.**, p. 1707–1745, 2005.
- DASGUPTA, ET AL. Avertroa Carambola: An Updated Review. **International Journal of Pharma Research & Review**, v. 2, n. 7, p. 54–63, 2013.
- DOS SANTOS, L. E. B. et al. Branches of *Gliricidia sepium* used as mulch for weed

control in corn: Cobertura do solo com ramos de *Gliricídia sepium* no controle de plantas daninhas em milho. **Revista Ciencia Agronomica**, v. 51, n. 1, p. 1–9, 2020.

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

DELGADO, J. M. F. **Preparação e caracterização de nanotransportadores (nanocápsulas, nanoesferas, lipossomas e transportadores lipídicos nanoestruturados) sem substância ativa**. GOIANIA: [s.n.], 2013.

DE SOUSA DIAS, A. L.; DE SOUZA, J. N. S.; ROGEZ, H. Purification of phenolic compounds from *inga edulis* leaves using solid-phase extraction: major compounds quantification and antioxidant capacity evaluation. **Quimica Nova**, v. 33, n. 1, p. 38–42, 2010.

DEWICK, P. M. The biosynthesis of shikimate metabolites. **Nat.Prod.Rep**, p. 17-58, 1998.

DHAWAN, S.; KAPIL, R.; SINGH, B. Formulation development and systematic optimization of solid lipid nanoparticles of quercetin for improved brain delivery. **J Pharm Pharmacol**, p. 342–351, 2011.

DIAS, L. G.; PEREIRA, A. P.; ESTEVINHO, L. M. Comparative study of different Portuguese samples of propolis: pollinic, sensorial, physicochemical, microbiological characterization and antibacterial activity. **Food Chem Toxicol.**, p. 4246-4253, 2012.

DONG, Y.-D.; BOYD, B. J. Applications of X-ray scattering in pharmaceutical science. **International Journal of Pharmaceutics.**, p. v. 417, p. 101-111, 2011.

DOPP, E. et al. Toxicity of volatile methylated species of bismuth, arsenic, tin, and mercury in mammalian cells in vitro. **J. Toxicol.**, 2011.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. **Avaliação da Atividade Antioxidante Utilizando Sistema β Caroteno / Ácido Linoléico e Método de Sequestro de Radicais DPPH**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, SP, p. 446-452, 2006

DUTRA, R. P. et al. Avaliação farmacognóstica de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith da Baixada maranhense, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 4, Out./Dez. 2008. 557-562.

DUTRA, R. P.; ABREU, B. V. D. B.; CUNHA, M. S. E. A. Phenolic acids, hydrolyzable tannins, and antioxidant activity of geopropolis from the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. v. 62, n. n. 12, p. p. 2549- 57, 2014.

DUTRA.; P, R. **Bioprospecção Da Geoprópolis De Melipona Fasciculata Smith Como Insumo Na Geração De Produtos Leishmanicidas**. [S.L.]: Tese De Doutorado - Programa De Pós-Graduação Em Biotecnologia/Renorbio, 2012.

ECHEVARRIA, G. et al. Assessment and control of the bioavailability of nickel in soils. **Environ. Toxicol. Chem.**, p. 643–651, 2006.

ELTZ, T.; BRÜHL, C. A.; GÖRKE, C. Collection of mold (*Rhizopus* sp.) spores in lieu of pollen by the stingless bee *Trigona collina*. **Insects Sociaux**, p. 28-30, 2002.

EMBRAFARMA. **Gel transdérmico: teoria e aplicação**. São Paulo: [s.n.], 2010.

ENGEL, P.; MORAN, N. A. The gut microbiota of insects - diversity in structure and function. **FEMS Microbiology Reviews**, p. 699-735, 2013.

ESTOPA, C. Veja porque usar bases galênicas na sua farmácia de manipulação. **Ibero química**, 19 Agosto 2019. Disponível em: <<http://www.iberoquimica.com.br/blog/bases-galenicas/>>. Acesso em: 21 mar. 2021.

EXLEY, C. E. A. Aluminium and breast cancer: sources of exposure, tissue measurements and mechanisms of toxicological actions on breast biology. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 2013.

FARNESI, A. P.; ET.AL. Effects of stingless bee and honey propolis on four species of bacteria. **Genetics and Molecular Research**, p. 635-640, 2009.

FERRAZ, R. E. E. A. Microbiota fúngica de *Melipona subnitida* Ducke (Hymenoptera: Apidae). **Neotrop. entomol.**, p. 345-346, 2008.

FERREIRA, A. O. **Guia Prático da Farmácia Magistral**. Juiz de Fora, MG,: 2ª edição, 2002.

FERREIRA, B. L. et al. Southern-Brazilian geopropolis: A potential source of polyphenolic compounds and assessment of mineral composition. **Food Res. Int**, p. 126, 2019.

FERREIRA, J. M. et al. Antioxidant Activity of a Geopropolis from Northeast Brazil: Chemical Characterization and Likely Botanical Origin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2017.

FERREIRA, M. M. C. et al. QUIMIOMETRIA I: CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA, UM TUTORIAL. **QUIMICA NOVA**, p. 724-731, 1999.

FERREIRA, R. C. et al. **Microencapsulations of the geopropolis extract of *Melipona quadrifasciata anthidioides* using Pluronic Lecithin Organogel (PLO)**. 22º International Symposium on Microencapsulation. Salvador-BR: [s.n.]. 2019.

FIB. REVISTA-FI.COM.BR. **FOOD INGREDIENTES BRASIL**, p. 31-36, 2013.

FINGER, D. et al. Propolis as an indicator of environmental contamination by metals. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, p. 259–264, 2014.

FIORATTI., A. B. . M. P. G. . F. C. D. B. G. 1. K. S. G. . J. R. R. . S. L. F. **Avaliação Físico-Química De Emulsões Contendo Própolis: Uma Contribuição Ao Controle De Qualidade**. Anais da 57ª Reunião Anual da SBPC. Fortaleza, CE : epartamento de Farmácia e Farmacologia, Universidade Estadual de Maringá - UEM). 2005.

FIRMINO, L. A. A. M. M. P. S. Polifenóis totais e flavonoides em amostras de chá verde (*Camellia sinensis* L.) de diferentes marcas comercializadas na cidade de Salvador-BA. **Rev. bras. plantas med.[online]**., p. vol.17, n.3, pp.436-443, 2015.

FLAMBÓ, D. F. A. L. P. **Atividades Biológicas dos Flavonoides: Atividade Antimicrobiana**. PORTO: Universidade Fernando Pessoa, 2013.

FRANCHIN, M.; ET.AL. Bioactive fraction of geoprópolis from *Melipona scutellaris* decreases neutrophils migration in inflammatory process: involvement of nitric oxide pathway. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2013.

FREIRES, I. A.; ALENCAR, S. M. D.; ROSALEN, P. L. A pharmacological perspective on the use of Brazilian Red Propolis and its isolated compounds against human diseases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, p. 267-279, 2016.

FREIRES, I. A.; ALENCAR, S. M.; ROSALEN, P. L. A pharmacological perspective on the use of Brazilian Red Propolis and its isolated compounds against human diseases. **Eur J Med Chem**, p. 267-79, 2016.

FRÉZARD. F., S. D. A. . R. O. G. F. . D. C. Lipossomes:Physicochemical and pharmacological properties, applications in antimony-based chemotherapy. **Quím Nova**, p. v.28, p. 511-518, 2005.

FRIEDRICH, M.; FABIAN TEIXEIRA PRIMO, J. A. B. F.; LUCIANE VARINI LAPORTA, M. P. A. Avaliação da Estabilidade Físico-Química de Creme Não Lônico Inscrito no Formulário Nacional. **Lat. Am. J. Pharm.**, p. 26 (4): 558-62 , 2007.

FRIGERIO, C. **Optimização e influência na bioactividade do processo de secagem por radiação infravermelha de amostras de pólen apícola**. Porto. 2009.

GATEA, F. et al. Antitumour, antimicrobial and catalytic activity of gold nanoparticles synthesized by different ph propolis extracts. **Nanopart Res**, 2015.

GELATTI, L. C. et al. Staphylococcus aureus resistentes à metilina: disseminação emergente na comunidade. **An Bras Dermatol.**, p. 501 - 506, 2009.

GEMIM, B. S.; SILVA, F. A. D. M. Meliponicultura Em Sistemas Agroflorestais: Alternativa De Renda, Diversificação Agrícola E Serviços Ecosistêmicos. **Agroambiente**, p. 361-372, 2017. ISSN doi:<http://dx.doi.org/10.18227/1982-8470ragro.v11i4.4156>.

GENNARO, A. R. **Remington a ciência e a prática da farmácia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

GENUIS, S. J.; BOUCHARD, T. P. Combination of micronutrients for bone (COMB) study: bone density after micronutrient intervention. **J. Environ. Public. Health.**, 2012.

GHISALBERTI, E. L. Propolis: A review. **Bee World**, 1979. 59-84.

GINÉ, M. F. . **Espectrometria de emissão atômica plasma acoplado indutivamente ICP-AES**. PIRACICABA: USP, 1998.

GREGORY SR, P. N. P. M. P. M. H. J. Comparison of propolis skin cream to silver. **Med**, p. 8: 77-83., 2002.

GOMES, D. J. et al. Possibilidades de uso do Anacardium occidentale em uma perspectiva farmacológica. **Revista de Agroecologia no Semiárido**, v. 2, n. 2, p. 10, 2018.

GUO, X. et al. Chemical composition and antioxidant activities of water extract of Chinese propolis. **J. Agric. Food Chem.**, 2011.

GUPTA, V. E. A. Pharmacological Potentials Of Citrus paradisi - An Overview.. **International Journal Of Phytotherapy Research**, p. 1, 2011.

H., M. PRÓPOLIS: Uma Revisão Dos Recentes Estudos De Suas Propriedades Farmacológicas. **Arq. Inst. Biol**, 2005. 405-411.

HAMILTON, E. I. Environmental variables in a holistic evaluation of land contaminated by historic mine wastes: a study of multi-element mine wastes in West Devon, England using

arsenic as an element of potential concern to human health. **Sci. Total Environ**, p. 171-221, 2000.

HERVATIN, H. L. **Avaliação microbiológica e físico-química de pólen apícola in natura e desidratado sob diferentes temperaturas**. Campinas: Dissertação (Mestrado em Ciências de alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 2009.

HOU, X. et al. Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry. **Encyclopedia of Analytical Chemistry**, p. Disponível em: <
<https://doi.org/10.1002/9780470027318.a5110.pub3>>, 2016.

HUA, S.; WU, S. Y. The use of lipid-based nanocarriers for targeted pain therapies.. **Frontiers in pharmacology**, p. v. 4, p. 143, nov , 2013.

HUBER, L. S.; AMAYA, D. B. R. Flavonóis E Flavonas: Fontes Brasileiras E Fatores Que Influenciam A Composição Em Alimentos. **Alim. Nutr**, p. 97-108, 2008.

IBRAHIM, M. M.; HAFEZ, S. A.; MAHDY, M. M. Organogels, hydrogels and bigels as transdermal delivery systems for diltiazem hydrochloride.. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, p. 8(1), 48-57, , 2013.

IDSON, B. Stability testing of emulsions. **I. Drug Cosm. Ind.**, p. ,v. 151, n. 1, p. 27-30, , 1993.

IWANSYAH, A. C. et al. Evaluation on the physicochemical properties and mineral contents of Averrhoa bilimbi L. leaves dried extract and its antioxidant and antibacterial capacities. **Food Science and Technology**, v. 2061, p. 1–6, 2021.

INUI, S. et al. Identification of the phenolic compounds contributing to antibacterial activity in ethanol extracts of Brazilian red propolis. **Natural Product Research**, p. DOI: 10.1080/14786419.2014.898146, 2014.

ISAAC, V. et al. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Protocolo para ensaios físico-químicos de**, p. 81-96, 2008.

IURLINA, M. O.; FRITZ, R. Characterization of microorganism in Argentinean honeys from different sources. **International journal of food microbioly**, p. 207-304, 2005.

JAGDALE, S. C. et al. Development and evaluation of pluronic lecithin organogel topical delivery of tapentadol. **American Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology**, , p. 2(1), 1-21, , 2015.

JAIN, S.; PATEL, N. . S. M. K. . K. P. . V. N. Recent Advances in Lipid-Based Vesicles and Particulate Carriers for Topical and Transdermal Application. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2016. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2016.

JATUNOV, S. et al. Carotenoid composition and antioxidant activity of the raw and boiled fruit mesocarp of six varieties of *Bactris gasipaes*. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 60, n. 1, p. 99–104, 2010.

JAUTOVÁ, J. . H. Z. . . K. D.; N, . A.; B.G, . . Lip creams with propolis special extract GH 2002 0.5% versus aciclovir 5.0% for herpes labialis (vesicular stage). **Wien Med Wochenschr** , p. 169:193–201, 2019.

JESUS, J. N. **Estudo Do Comportamento Higiênico Em Melipona quadrifasciata anthidioides**. CRUZ DAS ALMAS: DISSERTAÇÃO DE MESTRADO, 2016.

- JHAWAT, V. . G. S. . & S. V. Formulation and evaluation of novel controlled release of topical pluronic lecithin organogel of mefenamic acid.. **Drug Delivery**, p. 1-9, , 2016.
- JUGDAOHSINGH, R. Silicon and bone health. **J. Nutr. Health Aging**., p. 99–110, 2007.
- JÚNIOR, A. F. S. et al. Multielement Determination of Macro and Micro Contents in Medicinal Plants and Phytomedicines from Brazil by ICP OES. **J. Braz. Chem. Soc.**, p. Vol. 28, No. 2, 376-384, 2017.
- JUNIOR, W.; SANTOS, D. O. S. Extração De Compostos Antioxidantes Da Folha De Mangueira (Mangifera Indica L.) Utilizando Co 2 Supercrítico, Água E Etanol. **Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas**, p. 112, 2013.
- JÚNIOR, U. P. S. et al. Geopropolis gel for the adjuvant treatment of candidiasis – formulation and in vitro release assay. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, p. 278-286, 2019.
- KALIL, M. et al. Brazilian green propolis as a therapeutic agent for thr post-surgical treatment of caseous lymphadenitis in sheep. **Front. vet. Scie.**, 2019.
- KEIBLINGER, K. M. et al. Assessment of Cu applications in two contrasting soils—effects on soil microbial activity and the fungal community structure,. 27 (2018) 217–233. **Ecotoxicology**, p. 217-223, 2018.
- KERR, W. Abelhas indígenas brasileiras (meliponíneos) na polinização e na produção de mel,pólen, geoprópolis e cera. **Inform. Agropec**, 1987. 15-27.
- KERR, W. E.; ABSY, M. L.; MARQUES-SOUZA, A. C.. Espécies nectaríferas e poliníferas utilizadas pela abelha *Melipona compressipes fasciculata*. **Acta Amaz**, 1986/1987. 145-155.
- KERR, W. E.; CARVALHO, G. A.; NASCIMENTO, V. A. Abelha Uruçu: Biologia, Manejo e Conservação. **Fundação Acangaú**, p. 143, 1996.
- KIM, J. Y. Antimelanogenic and Antioxidant Properties of Gallic Acid;. **Biol. Pharm. Bull**, p. 1052-1055, 2007.
- KITA-TOKARCZYK, K. . G. J. . H. T. & M. W. Block copolymer vesicles-using concepts from polymerochemical to mimic biomembranes. **Polímero**, p. 4,6 3540-3563, 2005.
- KNORST, M. T. **Desenvolvimento tecnológico de forma farmacêutica plástica contendo extrato concentrado de *Achyroclinesatureioides* (Lam.) DC. Compositae – marcela**. Porto Alegre: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1991.
- KORN, M. G. A. et al. Evaluation of sample preparation procedures for trace element determination in brazilian propolis by inductively coupled plasma optical emission spectrometry and their discrimination according to geographic region. **Food Anal. Methods**. , p. 872–880, 2013.
- KOROLKOVAS, A. **Dicionário Terapêutico**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. Ed. 2001/2002, Guanabara p.
- KREWSKI, D. et al. Human health risk assessment for aluminium, aluminium oxide, and aluminium hydroxide. **J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.**, 2007.

- KUJUMGIEV, A. . I. T. Y. S. V. B. R. C. A. S. P. "Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Journal of Ethnopharmacology, View at Publisher**, p. vol. 64. 235–240, 1999.
- KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry**, p. 329-339, 2004.
- KUNHN-NETO, B. C. F. A.; CASTRO, M. S. E. N. J. C. Pesquisas recrutamento a longa distância por uma abelha sem ferrão, *Melipona mandacaia*. **Apidologie**, p. 472-480, 2009.
- KUROPATRICKII, A. K.; SZLISZKA, E.; KROL, W. Historical Aspects of Propolis Research in Modern Times. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1-11, 2013.
- KWONG, W. K.; ET.AL. Dynamic microbiome evolution in social bees. **Science Advances**, p. Disponível em: , 2017.
- LAOUINI, A. et al. Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art. **Journal of Colloid Science and Biotechnology**., p. v.1, p. 147-168,, 2012.
- LASIC, D. D. Liposomes: from physics to applications. **Science Publishers, Amsterdam, Netherlands**., p. 1^a ed. Elsevier, 1993.
- LASIC, D. D. Novel applications of liposomes.. **Tibtech**., p. v. 16, 1998.
- LAVIE, P. (. . P. . . 1. . . P. 2.-2. **The relationship between propolis, poplar buds (Populus spp.) and castoreum**. XXV International Beekeeping Congress. Grenoble: Apimondia Publication house. 1975. p. 229-223.
- LAVINAS, F. C. . M. E. H. B. C. . G. B. L. S. A. C. F. A. R. A. S. M. M. B. A. . B. A. V. T. F. S. D. A. B. V. C. S. C. I. A. R. Brazilian stingless bee propolis and geopropolis: promising sources of biologically active compounds. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, p. BJP-535; 11, 2018.
- LEE, F. J. E. A. Saccharide breakdown and fermentation by the honey bee gut microbiome. **Environmental Microbiology**, p. 796–815, 2014.
- LEE, J. S.; FEIJEN, J.; J.. **Controlled Release**, p. 161, 473, 2012.
- LEMANOWICS, J. Dynamics of phosphorus content and the activity of phosphatase in forest soil in the sustained nitrogen compounds emissions zone. **Environ. Sci. Pollut. Res. Int.**, p. 33773–33782, 2018.
- LEWIŃSKA, K.; KARCZEWSKA, A. Antimony in soils of SW Poland—an overview of potentially enriched sites. **Environ. Monit. Assess.**, p. 70, 2019.
- LIMA, R. D. **Características Biológicas Da Geopropolis Da Abelha Social Sem Ferrão Uruçu (Melipona Scutellaris Latreille, 1811) Proveniente Da Baía Do Iguape-Ba**. Cruz das Almas: [s.n.], 2015.
- LINDAUER, M.; KERR, W. E. Communication Between The Workers Of Stingless Bees. **Bee World**, p. 29-41 & 65-71, 1960.
- LIONARDI, G. R.; GASPARI, L. R.; CAMPOS, P. M. B. G. M. Estudo da variação do pH da pele humana exposta à formulação cosmética acrescida ou não das vitaminas formulação

cosmética acrescida ou não das vitaminas. **An bras Dermatol, Rio de Janeiro**, p. 563 - 569, 2002.

LI-YUN, L. et al. Lime (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle) Essential Oils: Volatile Compounds, Antioxidant Capacity, and Hypolipidemic Effect. **foods**, v. 8, p. 398, 2019. ISSN 10.3390.

LOPES, S. C. A. **Lipossomas contendo ácido ursólico**: desenvolvimento, caracterização química e físico-química e avaliação da citotoxicidade. Belo Horizonte, 150f. Tese de doutorado. : Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal de Minas Gerais, 2014.

LOPES, S. C. A. **Lipossomas contendo ácido ursólico**: desenvolvimento, caracterização química e físico-química e avaliação da citotoxicidade. Belo Horizonte. Minas Gerais: Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal de Minas Gerais., 2014.

LOPES, S. **Perfil químico do extrato aquoso de cascas de banana (*Musa sp.*, CV. Prata anã) e avaliação in vitro dos seus efeitos sobre a cicatrização de lesões cutâneas e fotoproteção à radiação uvb**. Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade Federal de Santa Catarina Florianópolis, 2019.

LOPES., L. D. F. . M. P. D. V. R. C.; Maximino, J. A. S. C. D. S. G.; Villanova¹, C. O. **Preparo E Avaliação Da Qualidade De Creme Não Iônico Contendo Extrato De *Pereskia Aculeata* Miller (Cactaceae)**. XXII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica, XVIII Encontro Latino Americano de Pós-Graduação e VIII Encontro de Iniciação à Docência - Universidade do Vale do Paraíba. Paraíba PB: Universidade Federal do Espírito Santo, Departamento de Ciências Farmacêuticas. 2018.

LUCCHINI, R. et al. Manganese and developmental neurotoxicity. **Adv. Neurobiol.**, p. 13–34, 2017.

LUEBBERDING S, K. N. K. M. Skin physiology in men and women: in vivo evaluation of 300 people including TEWL, SC hydration, sebum content and skin surface pH. **Int J Cosmet Sci.**, p. Oct; 35; 477-83;, 2013.

LUO, H. et al. Kaempferol nanoparticles achieve strong and selective inhibition of ovarian cancer cell viability. **Int J Nanomedicine**, p. 3951–3959, 2012.

LUPE; A., F. **Estudo da composição química de óleos essenciais de plantas aromáticas da amazônia**. Campinas: dissertação de mestrado, 2007.

LUSTOSA, S. R. et al. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Rev. Bars. Farmacogn**, p. 447-454, 2008.

LUSTOSA, S. R. et al. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Rev. Bras. Farmacog**, 2008. p. 447-458.

MACHADO, G. T. B. P. **Desenvolvimento e avaliação inibitória 50% (IC50) das suspensões ana e citotóxica de nanopartículas de própolis para potencial uso intramamário**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2017.

MACHADO, J. O. Simbiose entre as abelhas sociais brasileiras (*Meliponinae*, *Apidae*) e uma espécie de bactéria. **Ciência e cultura**, p. 625-633, 1971.

- MALERBA, F.; ORSENIGO, L. Innovation and market structure in the dynamics of the pharmaceutical industry and biotechnology: towards a history friendly model. **Industrial and corporate change**, p. 667-703, 2002.
- MANRIQUE, A. J. . S. W. C. Flavonoides, actividades antibacteriana y antioxidante de propóleos de abejas sin aguijón, *Melipona quadrifasciata*, *Melipona compressipes*, *Tetragonisca angustula* y *Nannotrigona* sp. de Brasil y Venezuela. **Zootecnia Trop.**, p. 26(2): 157-166, 2008.
- MANRIQUE, A. J.; SANTANA, W. C. Flavonoides, actividades antibacteriana y antioxidante de propóleos de abejas sin aguijón, *Melipona quadrifasciata*, *Melipona compressipes*, *Tetragonisca angustula* y *Nannotrigona* sp. de Brasil y Venezuela. **Zootecnia Tropical**, p. 157-166, 2008.
- MARCUCCI, M. C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, p. 83-99, 1995.
- MARCUCCI, M. C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. **Quim. Nova**, 1996. 529- 536.
- MARCUCCI, M. C.; CUSTÓDIO, A. R.; PEREIRA, R. M. S. Própolis tipificada: um novo caminho para a elaboração de medicamentos de origem natural, contendo este produto apícola. **MENSAGEM DOCE**, 2007.
- MARIQUE, A. J.; SANTANA, W. C. Flavonoides, actividades antibacteriana y antioxidante de propóleos de abejas sin aguijón, *Melipona quadrifasciata*, *Melipona compressipes*, *Tetragonisca angustula* y *Nannotrigona* sp. de Brasil y Venezuela. **Zootecnia Trop.**, p. 157-166, 2008.
- MARKET RESEARCH FUTURE. Relatório de pesquisa de mercado global de própolis: informações por tipo de produto (cápsulas e comprimidos, spray, extrato e outros), categoria (à base de álcool e sem álcool), canal de distribuição [baseado em loja (supermercados e hipermercados, lojas. **Market Research Future**, 30 junho 2020. ISSN N/0298-HCR. Disponível em: <<https://www.marketresearchfuture.com/reports/propolis-market-782>>. Acesso em: 24 AGOSTO 2021.
- MARIO, C. et al. Caracterización De Dos Metabolitos Secundarios Aislados De Las Hojas De *Pouteria caimito*. p. 105, 2012.
- MARQUELE, F. D. et al. Propolis extract release evaluation from topical formulations by chemiluminescence and HPLC. **J Pharm Biomed Anal** , p. 461-468, 2006.
- MARTÍN, C. M. C. **Estudo químico do extrato etanólico das folhas de murraya paniculata (l) jack e avaliação da ação anti-inflamatória**. ARARAQUARA: PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, v. TESE DE DOUTORADO, 2018.
- MATSUDA, A. H. **Aplicação da técnica de radiação gama para a preservação de própolis**. São Paulo: Dissertação de mestrado. Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares, 2002.
- MATSUDA, A. H. **Caracterização e controle de qualidade de própolis proveniente de diversas regiões do Brasil**. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas/ Universidade de São Paulo, 2006.

- MAYERHOFF, Z. D. V. L. Uma análise sobre os estudos de prospecção tecnológica. **Cadernos de Prospecção**, p. 7-9, 2008.
- MENDEL, R.; BITTNER, F. Cell biology of molybdenum. **Biochim. Biophys. Acta.**, p. 621–635, 2006.
- MENEZES, C. Abelhas sem ferrão e microrganismos. **Organics news brasil**, p. DISPONÍVEL EM: , 2015.
- MENEZES, C. Portal do agronegócio. **Portal do agronegócio**, 09 nov. 2015. Disponível em: <<https://www.portaldoagronegocio.com.br/artigo/abelhas-sem-ferrao-e-microrganismos--parte-1-3627>>.
- MENEZES, H. Própolis: Uma Revisão Dos Recentes Estudos De Suas Propriedades Farmacológicas. **Arq. Inst. Biol.**, 2005. 405-411.
- MENEZES, H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Arquivos do Instituto Biológico**, p. 405-411, 2005.
- MERTINS, O. **Estudos físico-químicos e estruturais de lipossomas compósitos de fosfatidilcolina e quitosana**. Porto Alegre: Tese de doutorado. Programa de Pós Graduação em Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008.
- MELO, R. R. et al. Crescimento inicial de mudas de *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong. sob diferentes níveis de luminosidade. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias - Brazilian Journal of Agricultural Sciences**, v. 3, n. 2, p. 138–144, 2008.
- MIGLIATO, K. F. et al. Artigo. v. 17, n. 1, p. 94–101, 2007.
- MITSUI, T. et al. Cassane-type diterpenoids from *Caesalpinia echinata* (Leguminosae) and their NF- κ B signaling inhibition activities. **Phytochemistry**, v. 116, n. 1, p. 349–358, 2015.
- MIDORIKAWA, K. et al. Liquid chromatography-mass spectrometry analysis of propolis. **Phytochem Anal**, p. 366-373, 2001.
- MIORIN, P. L. et al. Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**, p. 913-920, 2003.
- MIRZOEVA, O. K.; CALDER, P. C. The effect of propolis and its components on eicosanoid production during inflammatory response. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.**, p. 441-449, 1996.
- MOE, S. M. Disorders involving calcium, phosphorus, and magnesium. **Prim Care**, p. 215, 2008.
- MORAIS, S. M. et al. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Rev. bras. farmacogn. [online]**, 2009.
- MOREIRA, A. D. A. **Avaliação De Genótipos De Aceroleiras Do Banco Ativo De Germoplasma Da Ufrpe Visando Resistência Ao Meloidogyne enterolobii**. Recife: Programa de Pós graduação em Agronomia, 2013.
- MOREIRA, L. L.; ROGÃO, M.; ESTEVINHO, L. Propolis Ao Longo Da História Da Humanidade. **Revista De Apicultura**, p. 21-24, 2011.

- MOREIRA, P. S. **Avaliação Da Atividade Antiviral De Extratos Obtidos Da Folha E Fruto De Morinda Citrifolia Contra O Vírus Dengue**. Natal-Rn: Centro De Biociências Programa De Pós Graduação Em Biologia Parasitária, 2017.
- MOREIRA, R. C. A.; BOAVENTURA, G. R. Regional geochemical reference for the interpretation of the concentrations of chemical elements in the sediments of the Lago Paranoá-DF basin. **Quím. Nova.**, p. 812–820, 2003.
- MORRISSEY, J.; GUERINOT, M. L. Iron uptake and transport in plants: the good, the bad, and the ionome. **Chemical reviews**, p. 4553–4567, 2009.
- MOURA, S. A. L. et al. Brazilian green propolis inhibits inflammatory angiogenesis in a murine sponge model. **Evid. Based Complement. Alternat. Med.** , p. 1-7, 2011.
- MOURÃO, L. C. D. S. **Abordagem Fitoquímica E Avaliação Da Atividade Biológica Das Espécies Manilkara Zapota (L.) P. Royen E Mimusops commersonii (G.DON) ENGL.** Campinas: Universidade Estadual de Campinas - Instituto de Biologia, 2017.
- MOURE, J. S. & K. W. E. Sugestões para a modificação da sistemática do gênero *Melipona* (HYMENOPTERA, APOIDEA). **Dusenya** 1, p. 105-129, 1950.
- MÜNSTEDT, K.; BOGDANOV, S. Bee products and their potential use in modern medicine. **Journal of ApiProduct and ApiMedical Science**, 3, 2009. 57 - 63.
- NASCIMENTO, A. L. D. R. **Ação antimicrobiana do extrato de Eugenia uniflora L. (pitanga) sobre Staphylococcus aureus, pseudomonas aeruginosas e Escherichia coli.** Campina Grande: Universidade Estadual da Paraíba, v. Trabalho de Conclusão de Curso, 2013.
- NASCIMENTO, E. Patentes E Apropriação De Valor Da Inovação: O Caso Da Própolis. **Cad. Prospec., Salvador**, p. 87-102, 2018.
- NASCIMENTO, T. G. et al. Polymeric Nanoparticles of Brazilian Red Propolis Extract: Preparation, Characterization, Antioxidant and Leishmanicidal Activity. **Nnanosale Research Letters**, 2016. 1-16.
- NATH, E. A. Kaempferide, the most active among the four flavonoids isolated and characterized from *Chromolaena odorata*, induces apoptosis in cervical cancer cells while being pharmacologically safe. **RSC Advances**, p. 1-26, 2013.
- NETO, A. F. S. **Obtenção de formulações galênicas contendo nano e microcapsulas de ácidos triterpênicos.** Salvador: Dissertação , Programa de Pós Graduação em Biotecnologia do Instituto de Ciências da Saúde, 2015.
- NEVES, P. **Importância dos compostos fenólicos dos frutos na promoção da saúde.** P. 80, 2015. Dissertação, faculdade de ciências da saúde universidade fernando pessoa.
- NIELSEN, F. H. History of Zinc in Agriculture. **Adv Nutr.**, p. 783–789, 2012.
- NOGUEIRA-NETO, P. **A Criação de Abelhas Indígenas Sem Ferrão.** São Paulo: Tecnapis, 1970. 446 P p.
- NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e Criação de Abelhas Indígenas Sem.** São Paulo: Nogueirapis, 1997. Ferrão. p.
- OLIVEIRA, A. Z. M. **Desenvolvimento de formulações cosméticas com ácido hialurônico -.** Portugal: Dissertação de mestrado-Universidade de Porto. , 2009.

- OLIVEIRA, K. A. M. . E. A. Atividade antimicrobiana e quantificação de Flavonoides e Fenóis totais em diferentes extratos de própolis. **Semina: Ciências Biológicas e Saúde**, v. 33, n. 2, p. 211-222, 2012.
- OLIVEIRA, L. P. D. et al. Caracterização química da geoprópolis de abelhas sem ferrão amazônicas. **I Encontro de Química do Norte - SBQ norte**, 2014.
- OLIVEIRA, M. L. & M. E. F. Stingless bees (Hymenoptera, Meliponini) feeding on stinkhorn spores (Fungi, Phallales): robbery or dispersal? **Rev. Bras. Zool.** 17 (3), p. 881-884, 2000.
- OLIVEIRA, M.S., H. A. O. . A. P. S. S. Determinação da atividade antioxidante em amostras de própolis egeoprópolis de abelhas sem ferrão da amazônia oriental. **VII Congresso Baiano de Apicultura e Meliponicultura, III Seminário Brasileiro de Própolis e Pólen VIII Seminário de Própolis do Nordeste Ilhéus-Bahia** , 2015.
- ONG, G. H. et al. Barium levels in soils and Centella asiatica. **Trop. Life Sci. Res.**, p. 55–70, 2013.
- PADILLA, M.; CLARCK, G. T.; MERRIL, R. L. J. Tipocal medications for orofacial neutropathic pain: a review. **J. Am. Dent. Assoc.**, p. 184-195, 2000.
- PAIXÃO, D. R. et al. Efeitos da própolis na proliferação de fibroblastos em lesões cutâneas de ratos. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, p. ;35(3):413-417, 2014.
- PALUDO, C. R.; PISHCHANY, G.; DOMINGUEZ, A. Microbial community modulates growth of symbiotic fungus required for stingless bee metamorphosis. **PLoS One**, p. 14-17, 2019.
- PAPOTTII, G. et al. Chemical and Functional Characterization of Italian Propolis Obtained by Different Harvesting Methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, p. 2852-2862., 2012.
- PARK, Y. K. et al. Comparação Das Características Físico-Químicas Das Própolis Produzidas Na Região Sub-Tropical Da América Do Sul: Evidência Fitoquímica De Sua Origem Botânica. **Apacame**, 2001.
- PARK , Y. K., I. M. I. . J. A. S. . A. N. M. F. Estudo Da Preparação Dos Extratos De Própolis E Suas Aplicações. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas , 1998.
- PASKINN, H. S. P. **Caracterização fenotípica e molecular de bactérias com atividade antagônica isoladas do tegumento de *Melipona seminigra* (Hymenoptera: Apidae: meliponini)**. Manaus: Universidade Federal Do Amazonas/ Programa De Pós-Graduação Em Diversidade Biológica, 2013.
- PAUSTENBACH, D. J. et al. A review of the health hazards posed by cobalt, Crit. **Rev. Toxicol.**, p. 316–362, 2013.
- PEREIRA, A. S. et al. Naturforsch, p. 117, 1998.
- PEREIRA, A. S.; SEIXAS, F. R. M. S.; NETO, F. R. A. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Quim. Nova**, 2002. 321-326.
- PERUGINI, M. et al. Heavy metal (Hg, Cr, Cd, and Pb) contamination in urban areas and wildlife reserves: honeybees as bioindicators. **Biol. Trace Elem. Res.**, p. 170–176, 2011.

- PESSOLATO, A. G. T. et al. Propolis and amnion reepithelialise second-degree burns in rats. **Burns**, p. 1192-1201, 2011.
- PHYSICO-CHEMICAL characteristics of microencapsulated propolis co-product extract and its effect on storage stability of burger meat during storage at 15 °C. **Food Science and Technology**, p. 76 06 e 313, 2017.
- PIERINI, G. et al. A porphyrin-based fluorescence method for zinc determination in commercial propolis extracts without sample pretreatment. **Luminescence** , 2017.
- PIETTA, P. G.; GARDANA, C.; PIETTA, A. M. Analytical methods for quality control of propolis. **fitoterapia**, p. 7-20, 2002.
- PINTO, L.; PRADO, N.; CARVALHO, L. Propriedades, usis e aplicações da própolis. **Revista Eletrônica de Farmácia**, p. 76-100, 2011.
- POPOV, B. B. et al. Assessment of heavy metals in propolis and soil from the pelagonia region, Republic of Macedonia. **J. Chem. Chem. Eng.**, p. 23–33, 2017.
- POPOVA, M. et al. Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis. **Phytochem Anal.**, p. 235-240, 2004.
- POPOVA, M. et al. Comparative study of the biological activity of própolis from different geographic origem: a statistical approach. **Macedonian Pharmaceutical Bulletin**, p. 9-14, 2014.
- POPRAVKO, S. A. Chemical composition of propolis, its origin and standardization, em: A Remarkable Hive Product: PROPOLIS. **Apimondia Publication House**, p. 15-18, 1978.
- PRIEST, D. Novo ingrediente ativo para a pele. **Cosmet Toilet**, p. 62-5, 2006.
- PYRZYŃSKA, K. Determination of molybdenum in environmental samples. **Anal. Chim. Acta**, p. 40-48, 2007.
- QUINTAL, E. B. et al. Aluminum, a friend or foe of higher plants in acid soils. **Frontiers in plant science**, p. 1767, 2017.
- RAFEIRO, D. F. B. **Novas estratégias de promoção da permeação transdérmica**. Lisboa: Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, 2013.
- RAMKISSOON, C. et al. Improving the efficacy of selenium fertilizers for wheat biofortification. **Sci. Rep.**, 2019.
- RAMOS, M. A. **Estudo da flora microbiana em colméia de Melipona scutellaris Latreille, 1811**. Uberlandia: Dissertação de mestrado. Pos-graduação em genética e bioquímica, Universidade Federal de Uberlandia., 1998.
- RASSU, G. et al. Propolis as lipid bioactive nano-carrier for topical nasal drug delivery Colloids and Surfaces B: **Biointerfaces**, p. , v. 136, p. 908–917 , 2015.
- RAYMAN, M. P. The importance of selenium to human health. **The Lancet.**, p. 233–241, 2000.
- RESK, S. S. Protocolo de Nagoya – O que significa a ratificação? **ECODEBATE**, São Paulo, 20 jul. 2020. ISSN ISSN 2446-9394. Disponível em: <<https://www.ecodebate.com.br/2020/07/20/protocolo-de-nagoya-o-que-significa-a-ratificacao/>>. Acesso em: 24 ago. 2021.

ROCHA, W. S. et al. Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do cerrado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 4, p. 1215–1221, 2011.

ROCHA, L. et al. Otimização do processo de extração de própolis através da verificação da atividade antimicrobiana. **Rev. Bras. Farmacog**, 71-74, 2003.

ROMAN, A.; MADRAS-MAJEWSKA, B.; POPIELA-PLEBAN, E. Comparative study of selected toxic elements in propolis and honey. **J. Apic. Sci.**, p. 97–106, 2011.

ROOHANI, N. et al. Zinc and its importance for human health: an integrative review. **J. Res. Med. Sci.**, p. 144–157, 2013.

ROSA, C. D.; CÂMARA, S. G.; BÉRIA, J. U. Representações e intenção de uso da fitoterapia na atenção básica à saúde. **Ciências & Saúde Coletiva**, v. 16, p. 311-318, 2011.

ROSSO, G. B.; ENGEL, P. Functional Roles and Metabolic Niches in the Honey Bee Gut Microbiota. **Curr Opin Microbiol**, p. 69-76, 2018.

ROUBIK, D. W. **Ecology and natural history of tropical bees**. New York: Cambridge University Press, 1989.

SAHEBI, M. et al. Importance of silicon and mechanisms of biosilica formation in plants. **Biomed. Res. Int.**, 2015.

SALES, G. W. P. et al. Efeito antimicrobiano e modulador do óleo essencial extraído da casca de frutos da *Hymenaea courbaril* L. **Revista de Ciências Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 35, n. 4, p. 709–715, 2014.

SALGUEIRO, F. B.; GUIDA, C.; CASTRO, R. N. Comparação da capacidade antioxidante e do teor em fenólicos de extratos etanólicos de própolis verde e vermelha. **39ª Reunião Anual Da Sociedade Brasileira De Química: Criar E Empreender**, 2016.

SANTOS, A. L. **Identificação da flora microbiana em colméias de meliponina**. Uberlândia: Uiversidade Federal de Uberlândia, 2007.

SANTOS, C. M. D. et al. Chemical Composition and Pharmacological Effects of Geopropolis Produced by *Melipona quadrifasciata anthidioides*. **Hindawi Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. 13, 2017. ISSN 8320804.

SANTOS, M. J. D. L. D. A. C. V. M. A. G. Avaliação da eficácia da pomada de própolis em portadores de feridas crônicas.. **Acta Paul Enferm** ; , p. 20 (2): 199-204., 2007.

SANTOS, N. C. **Avaliação da toxicidade de amostras de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith da Baixada maranhense frente à *Artemia salina***. Monografia. 50 f.(Graduação em Farmácia-Bioquímica), Universidade Federal do Maranhão, 2008.

SANTOS, T. L. A. et al. *Melipona mondury* produces a geopropolis with antioxidant, antibacterial and antiproliferative activities. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, p. 2247-2259, 2017.

SANTOS; F; ET.AL. Chemical profile and antioxidant, anti-inflammatory, antimutagenic and antimicrobial activities of geopropolis from the stingless bee *Melipona orbignyi*. **International journal of molecular sciences**, p. 953, 2017.

SCHWALFENBER, G. K.; GENUIS, S. J. The importance of magnesium in clinical healthcare. **Scientifica**, 2017.

SEEDS, I. A. et al. Effect of Varying Pretreatment Techniques on Nutrient Composition of iMedPub Journals Effect of Varying Pretreatment Techniques on Nutrient Composition of Indigofera Arrecta Seeds All essential experimental phases engaged in making. n. January 2017, 2020.

SEBRAE-BA. **Estudo De Mercado Agronegócios: Produção De Própolis.** Salvador: SEBRAE-BA, 2017.

SENA, M. G. T. **Atividade Antifúngica De Óleos Essenciais Contra Isolados De Fusarium Sp. Do Mamão (Carica papaya L.).** Fortaleza: Trabalho de Conclusão de Curso (graduação), 2018.

SERAFIM, M. C. et al. A utilização da forma farmacêutica transdérmica como possibilidade terapêutica na medicina antroposófica. **Arte Médica Ampliada**, p. 153 - 159, 2013.

SERRA, J.; ESCOLA, R. A study on the bacteriostatic activity of propolis. **Deutsche Lebensmittel Rundschau**, p. 242-246, 1995.

SEVEN, P. T. et al. The Effects of Propolis in Animals Exposed Oxidative Stress. In: LUSHCHAK, V. I. **Oxidative Stress—Environmental Induction and Dietary Antioxidants.** Rijeka: InTECH BOOK, 2012. p. 267-288.

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

SFORCIN, J. M.; BANKOVA, V. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? **Journal of Ethnopharmacology**, p. 253-260, 2011.

SHIRATA, M. M. F.; CAMPOS, P. M. B. G. M. Importance of texture and sensorial profile in cosmetic formulations development.. **Surg. Cosm. Dermatol.**, p. , v. 8, n. 3, p. 223-230, 2016.

SILVA, A. S. A. P. C. R. C. T. L. S. D. C. M. P. T. S. C. S. A. Uso Terapêutico Da Pomada De Própolis Em Diferentes Feridas Crônicas. **Biológicas e Saúde. 7.** , p. 7-10., 2017. ISSN 10.25242/886872420171160.

SILVA, E. C. C. D.; MUNIZ, M. P.; NUNOMURA, R. D. C. S. Constituintes Fenólicos E Atividade Antioxidante Da Geoprópolis De Duas Espécies De Abelhas Sem Ferrão Amazônicas. **Quim. Nova**, p. 628-633, 2013.

SILVA, G. R. et al. Aspectos bioecológicos e genético-comportamentais envolvidos na conservação da abelha Jandaíra, *Melipona subnitida* Ducke (Apidae, Meliponini), e o uso de ferramentas moleculares nos estudos de diversidade. **Agricultural Entomology**, p. 299-308, 2012.

SILVA, J. A. et al. Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, p. 125 - 131, 2010.

SILVA, J. B. et al. Quantificação de fenóis, flavonoides totais e atividades farmacológicas de geoprópolis de *Plebeia aff. Flavocincta* do Rio Grande do Norte. **Pesq. Vet. Bras.**, p. <https://doi.org/10.1590/s0100-736x2016000900014> , 2016.

SILVA, L. M.; AL, E. Propolis and Its Potential to Treat Gastrointestinal Disorders. **Hindawi Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 12, 2018.

- SILVA, P. D. **Determinação de compostos fenólicos por HPLC**. COVILHÃ: [s.n.], 2012.
- SILVA, T. M. S. D.; CAMARA, C. D. A.; SOUZA, U. P. **Formulação Cosmética Anti Candida Contendo Extrato De Geopropolis**. BR 102018008156-0 A2, 2019. Acesso em: 15/07/2020 .
- SILVA., L. R. S. Apifauna Visitante Floral Em Remanescente Florestal De Amélia Rodrigues. **Candombá – Revista Virtual**, V. 14, N. 1, P. 1-16, ISSN 1809-0362, 2018.
- SILVA; ALVINO, V. **Micropartículas de própolis-polímero para aplicação como produto cosmético multifuncional**. Maceió: Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, 2015.
- SILVEIRA, F. A.; R., M. G. A.; ALMEIDA, E. A. B. Abelhas brasileiras: sistemática e identificação, 253., 2002.
- SIMÕES. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis: Editora da UFRGS, Editora da UFSC, 2010.
- SIMÕES, C. C.; ARAÚJO, D. B.; ARAÚJO, R. P. C. Estudo in vitro e ex vivo da ação de diferentes concentrações de extratos de própolis frente aos microrganismos presentes na saliva de humanos. **Rev Bras Farmacogn**, p. 84-89, 2008.
- SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J. E. N. T. A. **Princípios de análise instrumental**. Porto Alegre: Bookman (SBQ), 2002.
- SNOWDON, J. A.; CLIVER, D. O. Microorganisms in honey. **International Journal of Food Microbiology**, p. 1-26, 1996.
- SOARES, M.; VITORINO, C.; SOUSA, J. P. A. Permeação cutânea: desafios e oportunidades. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**, p. 337 - 348, 2015.
- SOUSA, J. P. B. **Influência da sazonalidade no perfil químico dos óleos essenciais e das substâncias fixas de *Bacharis dracunculifolia*, cultivada utilizando-se cromatografia gasosa e líquida**. Ribeirão Preto: Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas - Universidade De São Paulo (Usp)/ Faculdade De Ciências Farmacêuticas De Ribeirão Preto, 2007.
- SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C. C.; DA COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, S. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAUJO, P. B. M.; BRANDAO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis Totais e Atividade Antioxidante de Cinco Plantas Medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351- 355, 2007
- SOUZA-MOREIRA, T. M. et al. Chemical and antidiarrheal studies of *plinia cauliflora*. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n. 12, p. 1590–1596, 2011.
- SOUZA, E. A. et al. Effects of seasonal variations and collection methods on the mineral composition of propolis from *Apis mellifera* Linnaeus Beehives. **Braz. J. Biol.**, p. 396-401, 2016.
- SOUZA, L. S.; et.al. Quantificação de coliformes em própolis e geopropolis de abelhas sociais sem ferrão (Hymenoptera: Apidae: Meliponina). **Magistra**, 2011.
- SOUZA, M. L. Preliminary survey of heavy metals in some soils in Paraná. **Rev. Sanare**, p. 68-75, 1996.

- SOUZA, R. N. G. D. Meliponicultura como fonte de renda sustentável nas comunidades Barreira do andirá e Laguinho do Andirá do município de Barreirinha-am. **CESP - Artigos de Periódicos**, 2017.
- SOUZA, S. A.; CAMARA, C. A.; SILVA, M. S. E. A. Composition and antioxidant activity of geopropolis collected by *Melipona subnitida* (Jandaíra) bees. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. v. 2013, p. p.1-6, 2013.
- SOUZA, M. S, R. J. P. Experimento didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio e análise de componentes principais: um tutorial, parte I. **Quím. Nova** , p. vol.35 no.1 , 2012.
- STRAZZULLO, P.; LEDERCQ, C. Sodium. **Adv. Nutr**, p. 188-190, 2014.
- SUAVE, J. et al. Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas.. **Revista Saúde e Ambiente**, p. , v. 7(2), , 2006.
- SULEMAN, T. et al. Antimicrobial activity and chemometric modelling of South African propolis. **J Appl Microbiol.**, p. 981-990, 2015.
- SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. Antimony toxicity. **Int. J. Environ. Res. Public Health.**, p. 4267–4277, 2010.
- TCHOUNWOU, P. B. et al. Heavy metals toxicity and the environment. **EXS. 101**, p. 133–164, 2012.
- TEIXEIRA, M. G.; DE MORAES, M. M.; DA CAMARA, C. A. G. Chemical profiles of essential oils and fatty acids from *erythrina velutina*. **Quimica Nova**, v. 42, n. 1, p. 65–70, 2019.
- TEIXEIRA, A. C. P.; ET.AL. *Starmerella meliponinorum* sp. nov., a novel ascomycetous yeast species associated with stingless bees. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, p. 339-343, 2003.
- TÉLLEZ, A. V. C. et al. Bioactivity, nutritional property, and rapid chemical characterization of aqueous extract of *Annona muricata* leaf from Mexico. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research March**, BENIN, v. 18, n. 3, p. 611-617, outubro ISSN 1596-5996, 2019.
- TERMENTZI, A.; KEFALAS, P.; KOKKALOU, E. LC–DAD–MS (ESI+) analysis of the phenolic content of *Sorbus domestica* fruits in relation to their maturity stage. *Food Chemistry*, p. v.106, p. 1234–1245, 2008.
- TOMAZZOLLI, M. M. **Prospecção de fontes botânicas e avaliação d efeito da sazonalidade no perfil químico da própolis de São Joaquim (Santa Catarina)**. Florianópolis: Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências/ Universidade Federal de Santan Catarina, 2015.
- TONHI, E. et al. Fases Estacionárias Para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (Clae–Fr) Baseadas Em Superfícies De Óxidos Inorgânicos Funcionalizados. **Quimica Nova**, p. 616 - 623, 2002.
- TORCHILIN, V. P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carrier. **Nature Reviews Drug Discovery**, p. 4:145-160., 2005.
- TORRES, A. R. **Ácido gálico em amostras da geoprópolis da *Melipona q. quadrifasciata* provenientes de Santa Catarina-SC**. Santa Catarina: Universidade

Federal de Santa Maria/Centro de Ciências da Saúde - Programa de Pós-graduação em Farmacologia, 2018.

TREVIÑO, S. et al. Vanadium in biological action: chemical, pharmacological aspects, and metabolic implications in diabetes mellitus. **Biol. Trace Elem. Res.**, p. 68–98, 2019.

VALDEZ, R. H. et al. In vitro and In vivo trypanocidal synergistic activity of nbutyl-1-(4-dimethylamino) phenyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxamide associated with benznidazole. **Antimicrob Agents Chemother**, p. 507–512, 2012.

VALENTE, A. L. P.; COLLINS, C. H.; MANFREDI, J. E. Conceitos básicos de cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, p. 103-109, 1983.

VARADHARAJAN, V. . U. K. J. V. K. Physicochemical, Phytochemical Screening And Profiling Of Secondary Metabolites Of Annona Squamosa Leaf Extract. **World Journal of Pharmaceutical research**, v. Volume 1, p. 1143-1164., ISSN ISSN 2277 – 7105, 2012.

VASCONCELOS, S. Análise de Componentes Principais (PCA). **Disponível em <http://www.ic.uff.br/~aconci/PCA-ACP.pdf>**, p. acessado em 19.11.2018, 2012.

VÁSQUEZ, A.; ET.AL. Symbionts as major modulators of insect health: lactic acid bacteria and honeybees. **Plos One**, 2012.

VELIKOVA, M. et al. Chemical composition and biological activity of propolis from Brazilian meliponinae. **Z. Naturforsch.**, p. 785–789, 2000.

VELIKOVA.; M., V. B. I. T. A. K. A. M. C. M. Antibacterial ent-kaurene from Brazilian propolis of native stingless bees. **Fitoterapia**, p. vol. 71, 693–696, 2000.

VEMURI, S.; RHODES, C. T. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review.. **Pharm. Acta Helvetica, Berne**, p. , v. 70, 1995.

VENTURIERI,. G. C. **Criação de abelhas indígenas sem ferrão**. Belém-PA: Ver Atual, 2008.

VILLAS-BÔAS, J. **Manual Tecnológico de Aproveitamento Integral dos produtos das Abelhas Nativas Sem Ferrão**. Brasília: Instituto Sociedade, População e Natureza, 2018.

VIOLANTE, I. M. P. et al. Avaliação in vitro da atividade fotoprotetora de extratos vegetais do cerrado de Mato Grosso. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, p. v.19, n2A, p.452-457, 2009.

WILLIMANN, H. et al. Lecithin organogel as matrix for transdermal transport of drugs. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, p. 81(9): 871-4, 1992.

WUANA, R. A.; OKIEIMEN, F. E. Heavy metals in contaminated soils: a review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. **ISRN Ecol.**, 2011.

YORK, P. Delineamento de formas farmacêuticas. In: AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. [S.l.]: Artmed, 2005.

YUYAMA, L. K. O. et al. Caracterização físico-química do suco de açaí de euterpe precatoria mart. oriundo de diferentes ecossistemas amazônicos. **Acta Amazonica**, v. 41, n. 4, p. 545–552, 2011.

YOSHIYAMA, M.; KIMURA, K. Bacteria in the gut of Japanese honeybee, *Apis cerana japonica*, and their antagonistic effect against *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American foulbrood. **Journal of Invertebrate Pathology**, p. 91-96, 2009.

ZAANON, A. B. **Aspectos teóricos e práticos sobre a avaliação da estabilidade de emulsões manipuladas em farmácia**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010.

ZABOROWSKA, M.; KUCHARSKI, J.; WYSZKOWSKA, J. Biological activity of soil contaminated with cobalt, tin, and molybdenum. **Environ. Monit. Assess.**, p. 398, 2016.

ZANIN, S. M. W. et al. Parâmetros Físicos No Estudo da Estabilidade das Emulsões Physicals Parameters In The Emulsion Stability Study. **Revista Visão Acadêmica**, p. 4, 2001.

ZDROJEWICZ, Z.; POPOWICZ, E.; WINIARSKI, J. Nickel - role in human organism and toxic effects. **Pol. Merkur. Lekarski.**, p. 115–118, 2016.

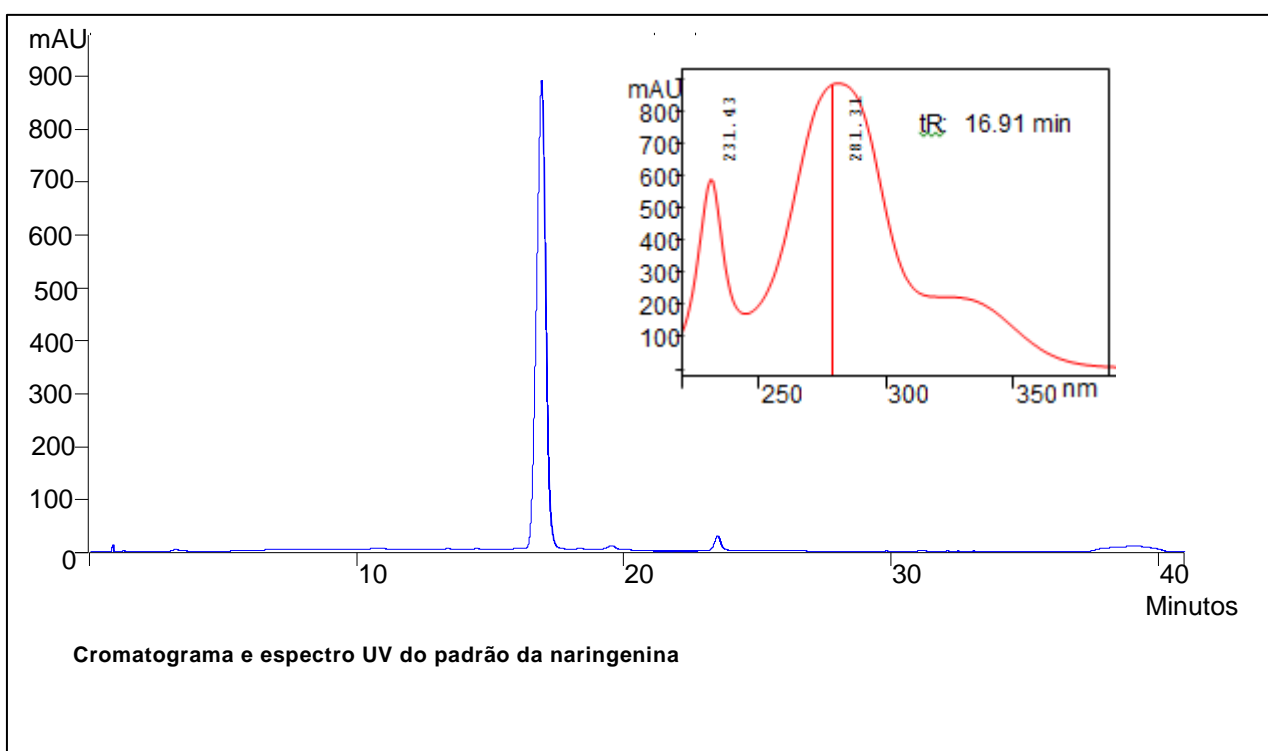
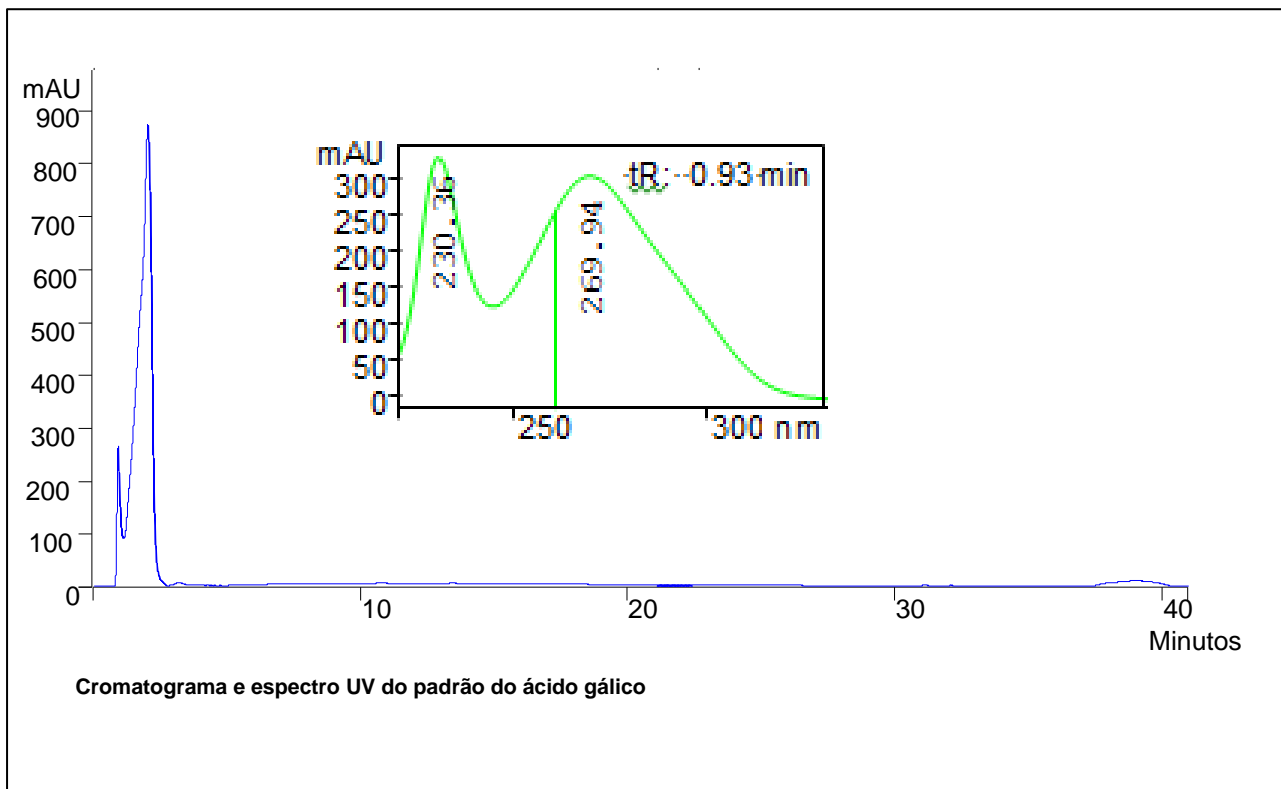
ZENG; H. J., J. M. R. Y. Y. J. A. L. B. Q. Anti-inflammatory activity of flavonoids from *Populus davidiana*. **Archives of Pharmacal Research**, p. vol. 29, 1102–1110, , 2006.

ZHAO, L. et al. Rapid Determination of Major Compounds in the Ethanol Extract of Geopropolis from Malaysian Stingless Bees, *Heterotrigona itama*, by UHPLC-Q-TOF/MS and NMR. **Molecules**, 2017.

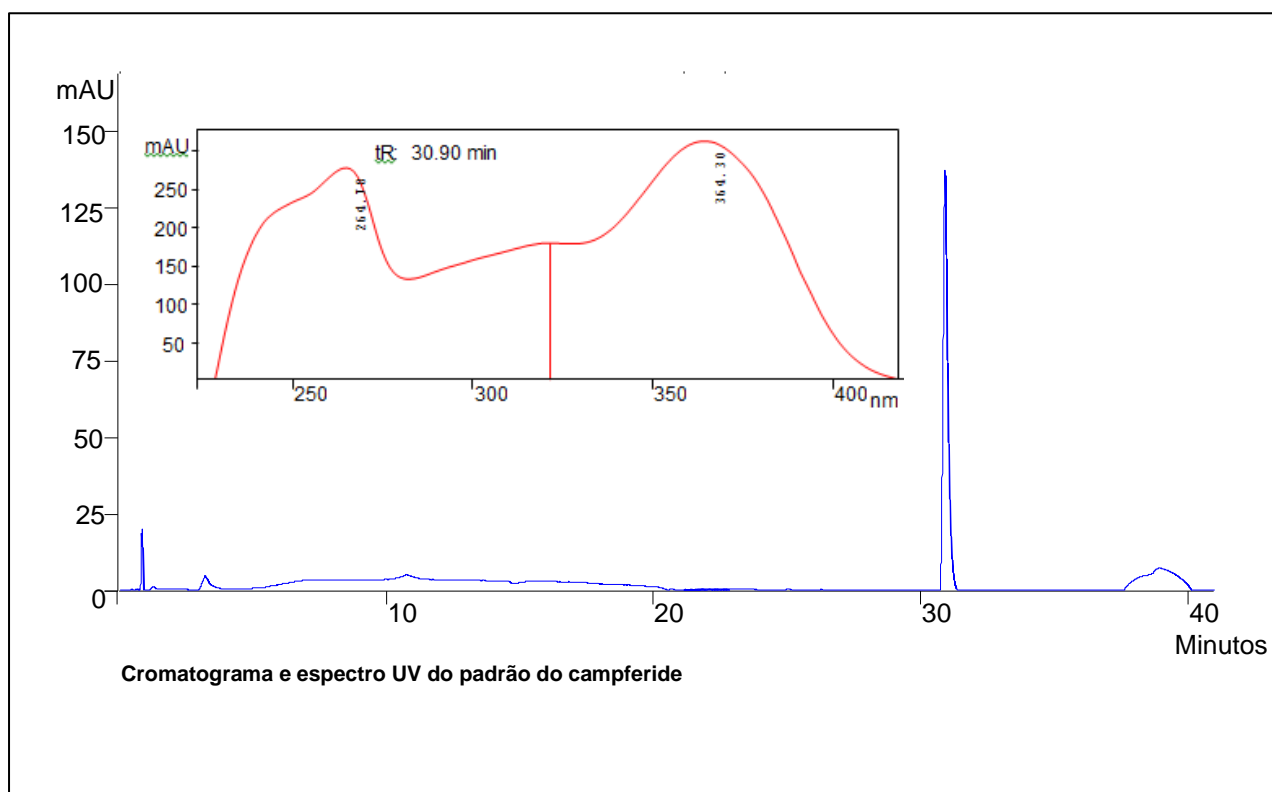
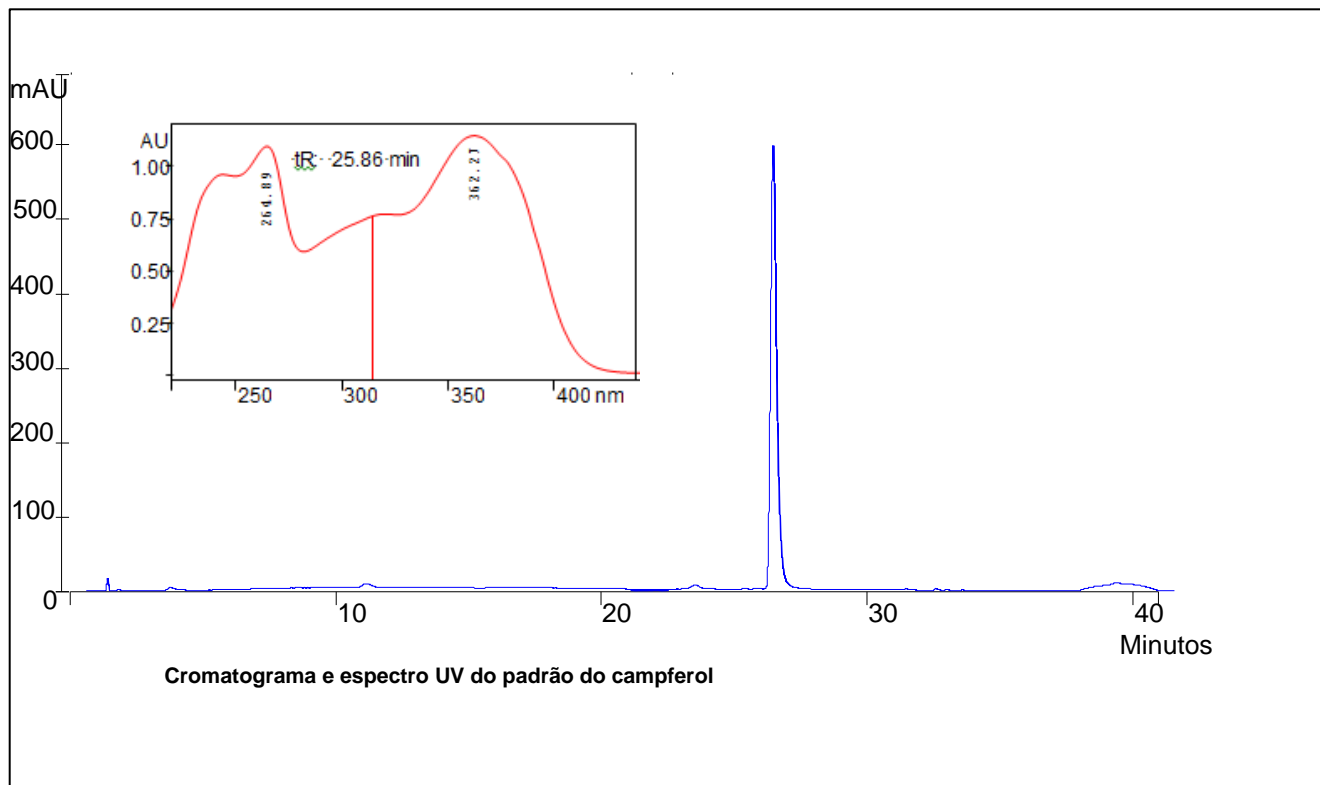
ZIMMERMENN, L. M. **Estudo da viabilidade da manipulação de medicamento em uma farmácia pública municipal do interior do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul/ Faculdade de Medicina/ Especialização em Saúde Pública, 2009.

MORAIS, S. M. de; CAVALCANTI, E. S. B.; COSTA, S. M. O.; AGUIAR, L. A. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Fortaleza, CE, v. 19, p. 315-320, 2009.

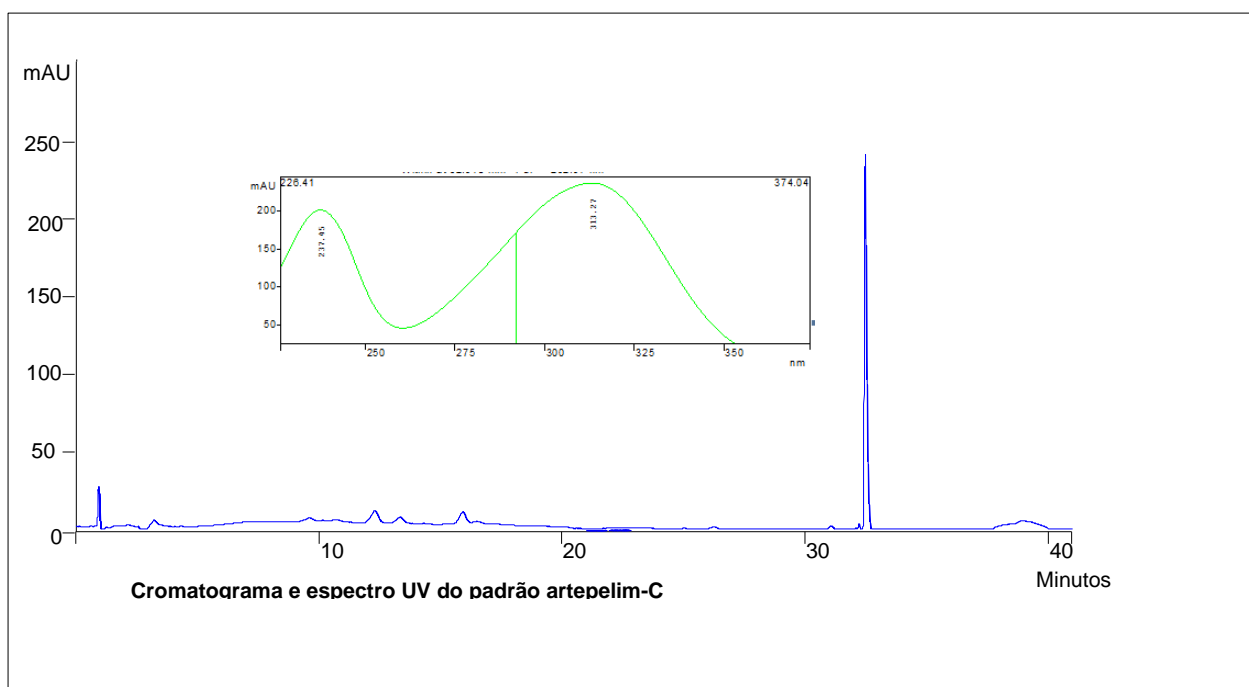
APÊNDICE A



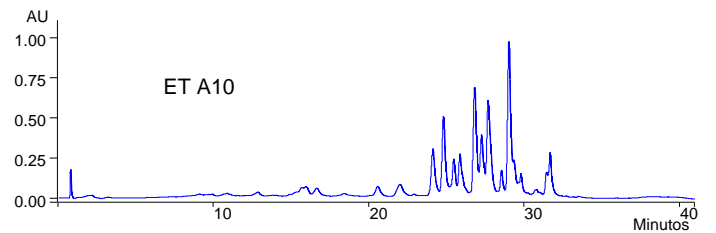
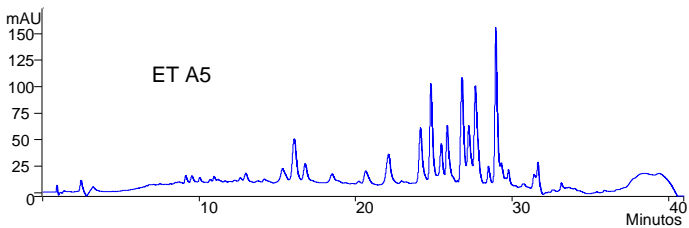
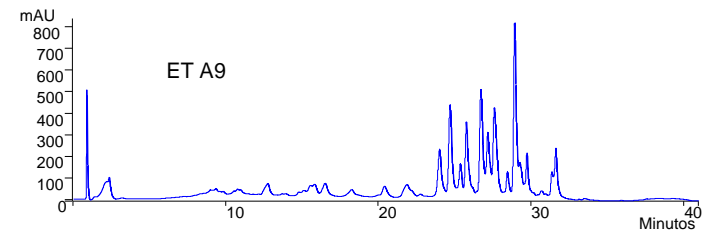
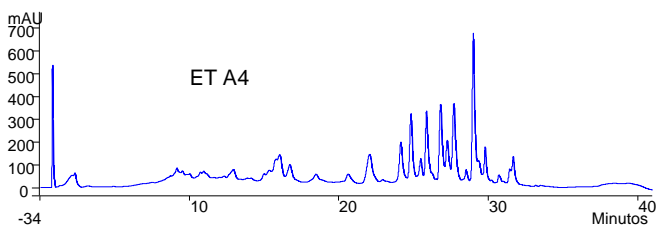
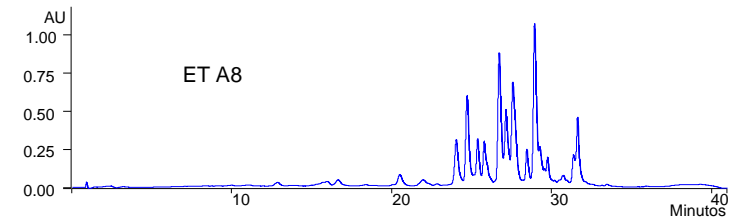
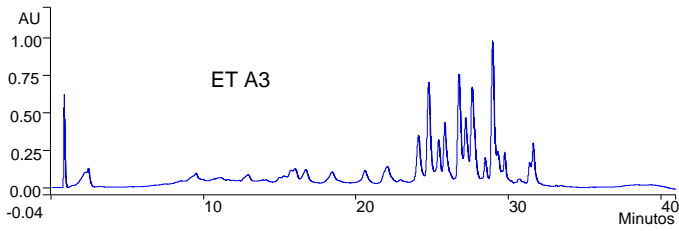
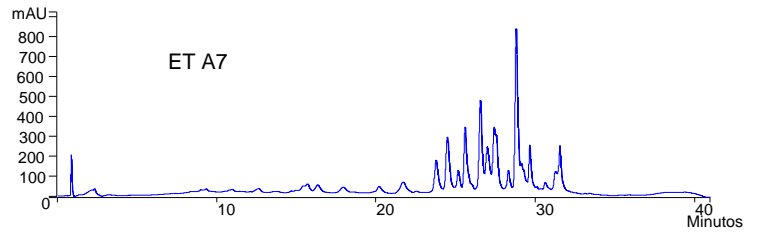
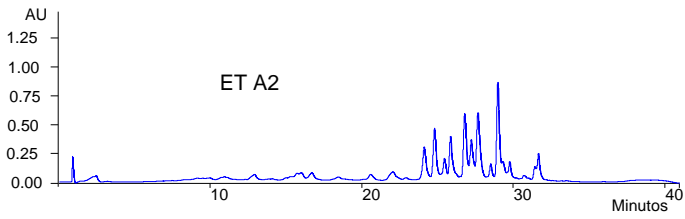
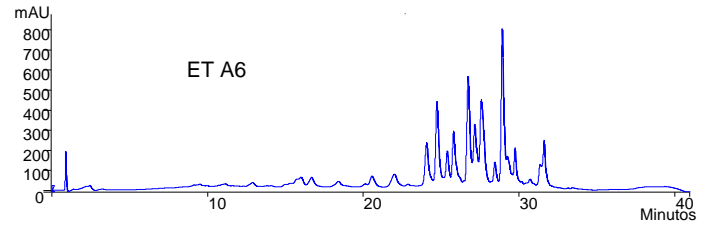
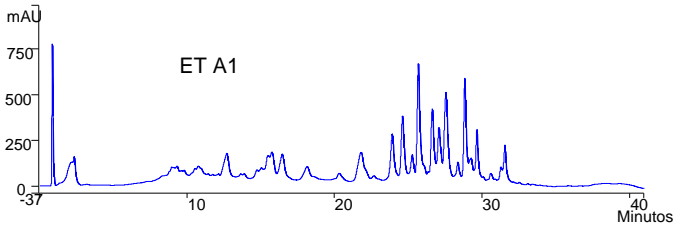
APÊNDICE B



APÊNDICE C

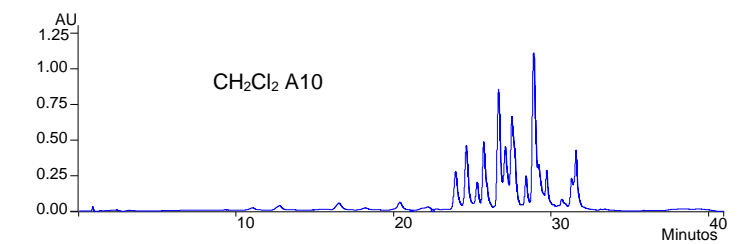
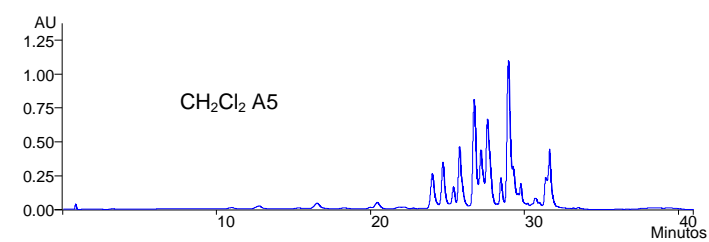
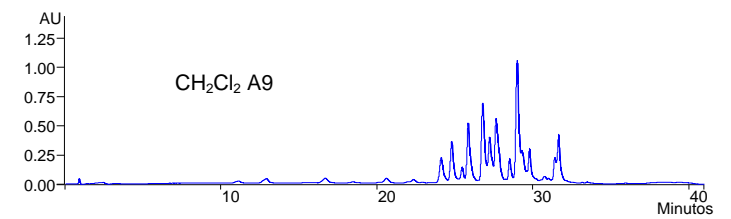
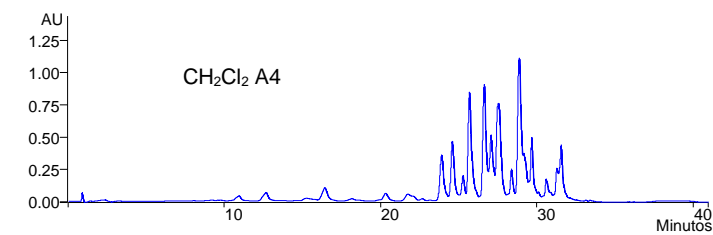
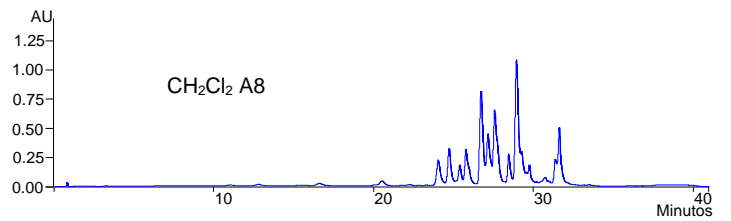
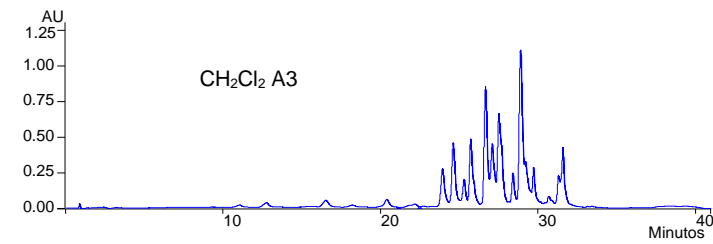
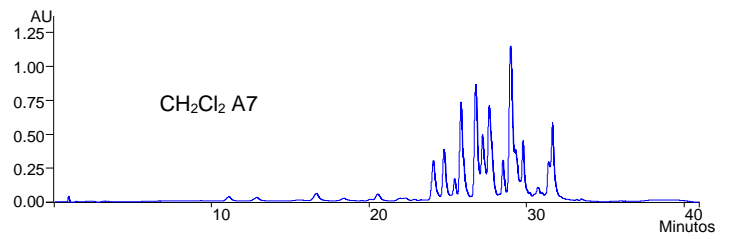
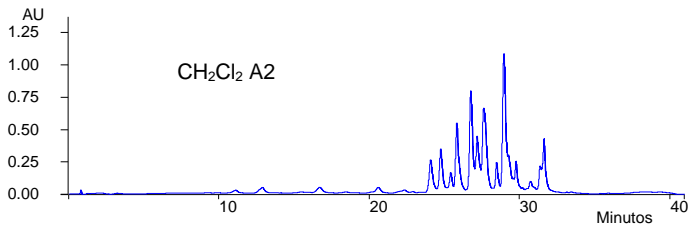
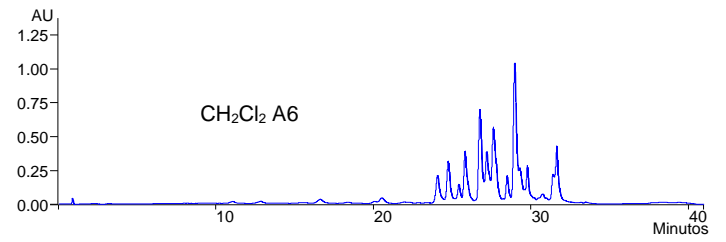
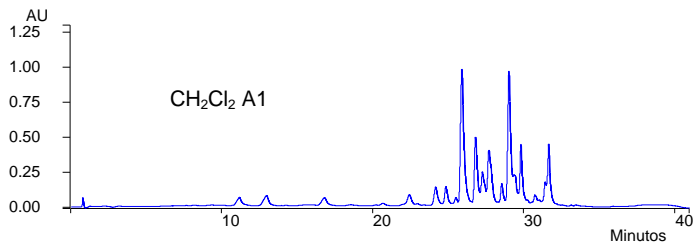


APENDICE D



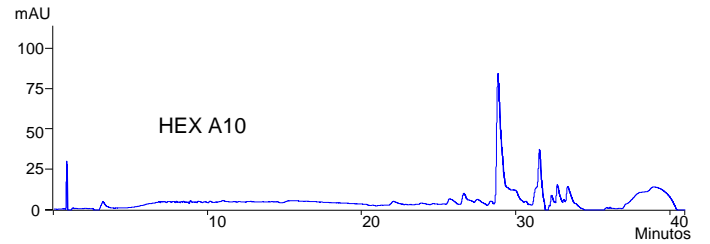
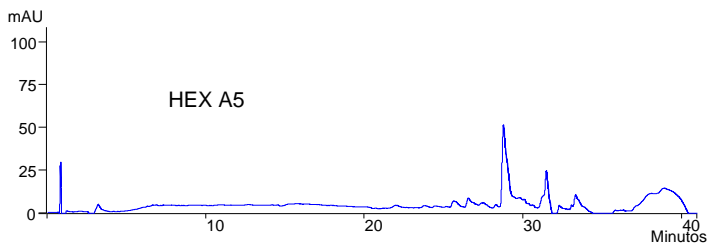
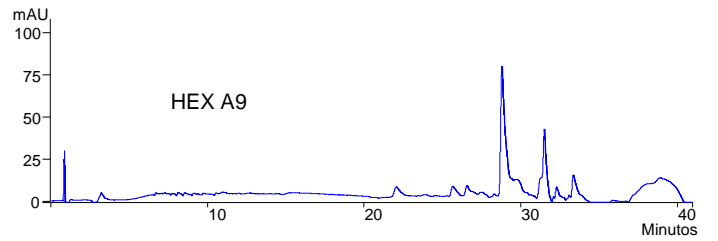
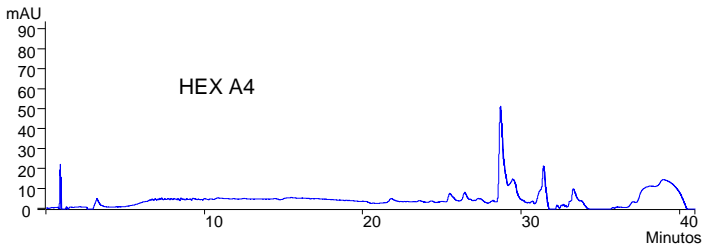
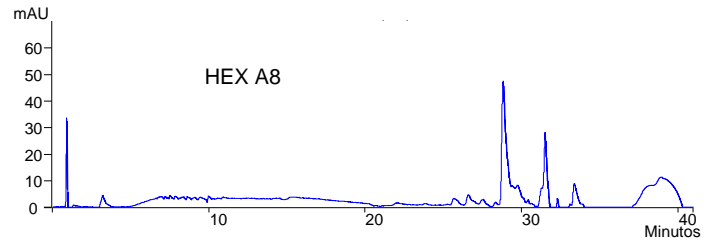
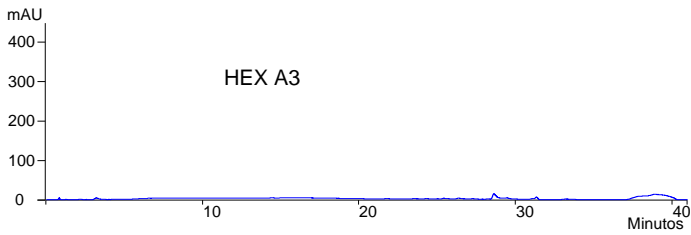
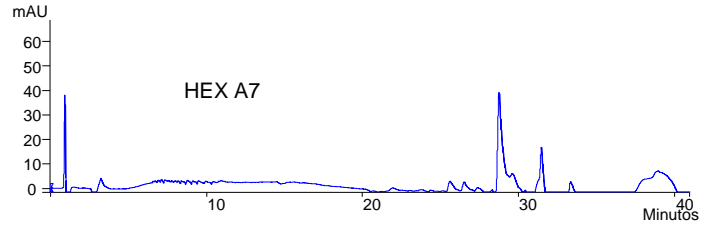
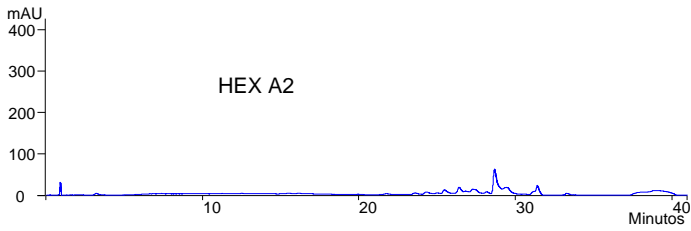
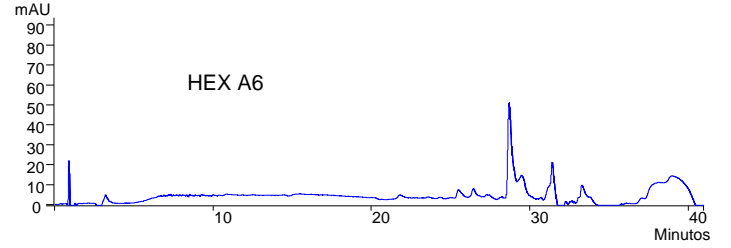
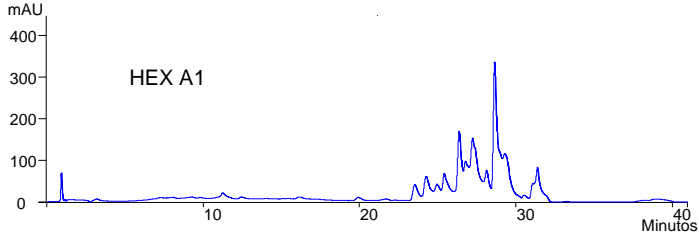
Cromatogramas dos extratos etanólicos da geoprópolis.

APÊNDICE E



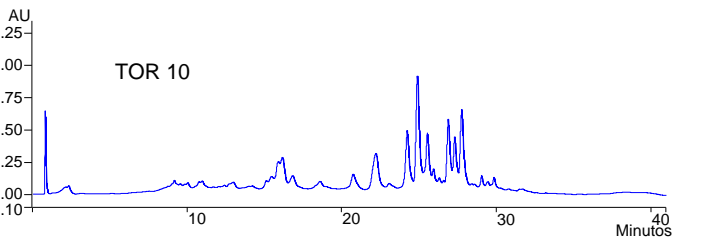
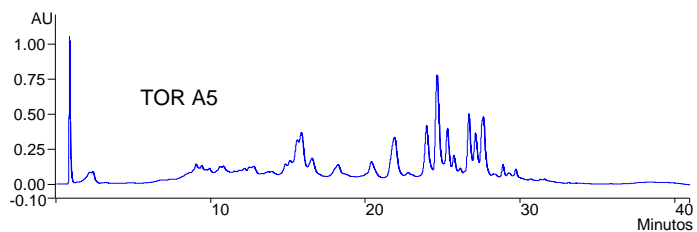
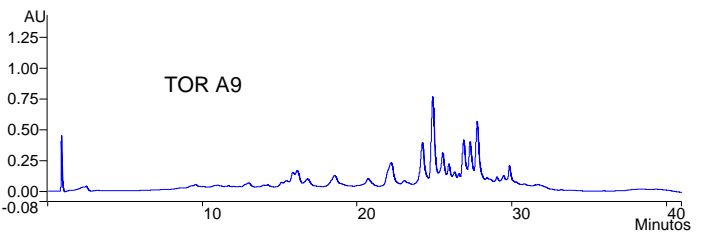
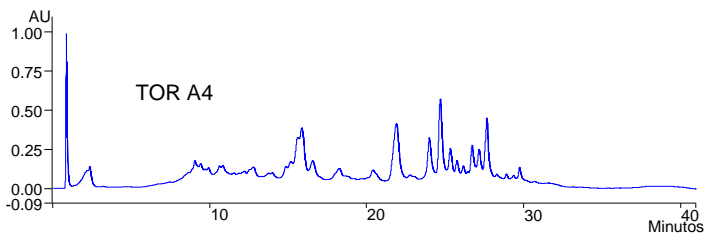
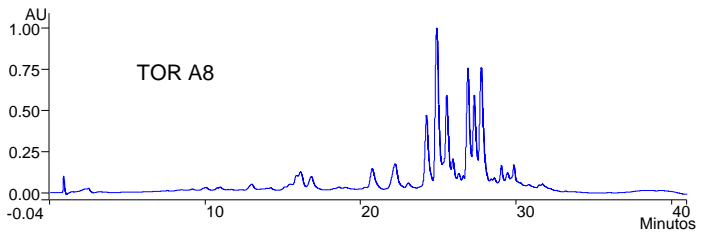
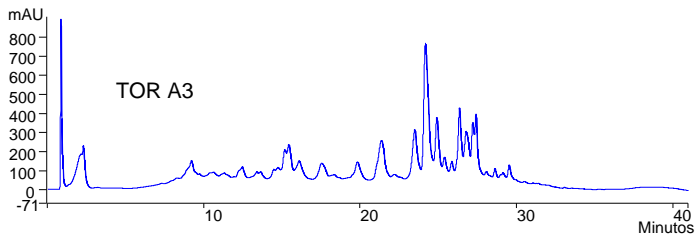
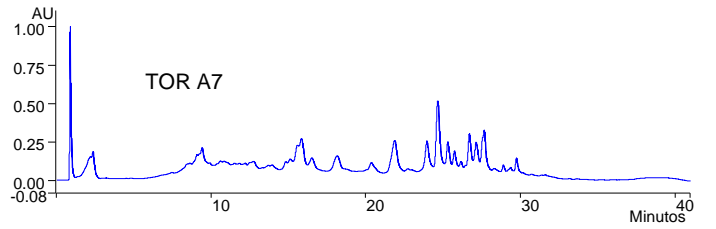
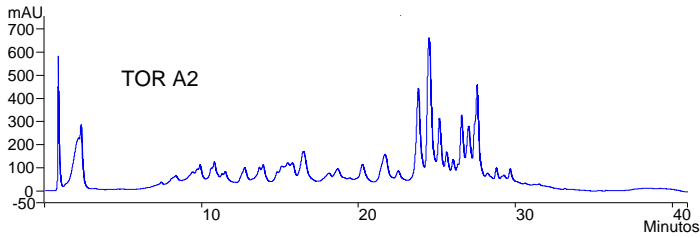
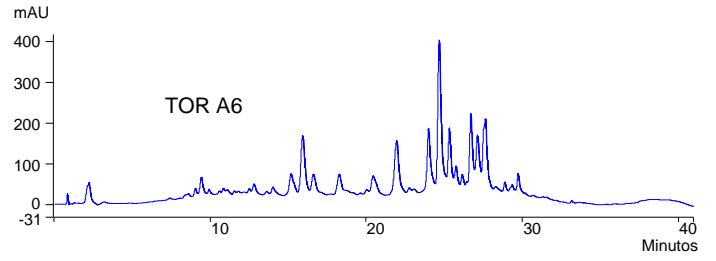
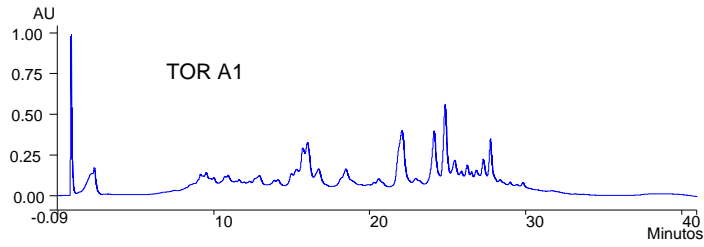
Cromatogramas das frações diclorometânicas do geoprópolis.

APÊNDICE F



Cromatogramas das frações hexânicas do geoprópolis.

APÊNDICE G



Cromatogramas das frações residuais (torta) do geoprópolis.

APÊNDICE H

Perfil químico - Tempo de retenção (Tr) x absorvância(λ) da extração etanólica do geoprópolis da *Melipona q. anthidioides* (1-10)

	λmáx EtA1	λmáx EtA2	λmáx EtA3	λmáx EtA4	λmáx EtA5	λmáx EtA6	λmáx EtA7	λmáx EtA8	λmáx EtA9	λmáx EtA10
0,93	235.42-267.88	231.31-272.07	234.66-267.72	233.20-268.32	228.58-257.30	231.34-270.65	231.60-268.52	230.40-279.14	233.17-267.91	228.85-272.56
2,46	228.02-270.00	227.63-270.09		228.03-269.77	227.18-270.68				227.55 - 269.85	
9,50			256.81-365.57	265.93						
12,97	234.96 - 307.55	308.87	306.64	307.19	298.74	231.70-309.34			308.08	
16,07	236.38-294.22		289.82	296.56	293.65	225.39 - 294.73	308.27		295,89	234.78-296.04
16,92	233.79-289.86	290.59	235,72-290.24	289.84	289.54	227.25-290.34	241.03 - 292.32	230.99 - 290.32	290.13	233.08 - 289.04
18,44	252.45-366.07		252.25-365.99	252.25-366.44	252.92	252.25-366.44	251.23 - 366.38	251.12 - 365.18	251.97-365.96	
20,61	285.61	241.36 - 287.45	237.67-286.75	287.71	286.57	286.52		233.15 - 287.07	286.56	
22,05	279.86	283.29	281.27	280.45	278.29	281.55	285.66	282.52	280.87	280.14
22,85	288.74							287.97	290,12	
24,21	234.72-298.59	234.68 - 294.62	233.60-292.43	235.23-293.52	292.31	227.99-292.01	235.62 - 292.47	231.75-291.72	234.27-293.22	232.15 - 292.21
24,85	240.93-291.8 9	241.49-290.97	241.71-291.24	241.55-290.64	243.29-289.68	239.34-289.81	241.77-290.14	241.21-290.27	241.30-290.03	241.03 - 290.15
25,86	255.59-356.50	255.11-356.67	255.51-356.86	239.69-291.21	290.14	228.70-290.79	232.75-291.27	231.75-290.83	232.66-291.19	231.80 - 290.92
25,91	233.22-292.34	233.42-291.35	232.72-291.31							
26,84	240.03-287.32	240.30-288.07	239.76-288.39	239.89-287.61	244.67-286.87	235.09-287.82	240.99-287.76	240.12-289.58	238.06-287.64	240.03-287.68
27,26	236.95-329.62	238.21-339.77	237.24-270.84-338.74	239.34-337.49	339.52	230.09-270.81-342.18	238.85-339.10	235.94-270.26-340.33	237.76-341.24	236.55-270.45-339.54
27,69	268.36	267.09-346.02	266.66-349.68	267.3-326.59	266.62-345.51	232.43-266.36-349.67	266.45-347.69	266.46-350.87	266.54-347.43	266.61-348.38
28,53	274.33-333.74	273.50-334.40	273.29-334.96	274.71-333.13	271.41-335.07	273.39-334.75	274.46-334.48	237.43-272.93-335.57	273.22-334.68	272.73-335.41
29,00	232.83-289.71	233.46-291.51	233.80-292.64	232.68-289.77		231.62-290.7	233.25-291.15	234.12-294.70	233.12-291.20	233.46-293.02
29,38	239.55-293.12	241.35-288.69	240.17-288.54	241.50-291.00	247.03-287.31	227.98-288.10	241,61-289.00	238.40-288.29	240.61-288.78	237.69-288.02
29,81	237.32-295.82	238.31-295.68	237.79-295.48	238.06-295.61	294.60	230.50-295.36	237.42-295.89	237.10-295.05	237.41-295.46	237.86-295.02
30,87	266.98-344.54							244.60-284.42	246.01-285.15	245.72-285.52
31,91	241.32-268.58-344.85	267.96-348.06	267.89-346.93	267.71-350.65	266.97-346.83	267.90-348.83	240.14-268.06-346.68	238.97-267.99-348.00	267.90-347.41	267.52-347.96

APÊNDICE I

Perfil químico - Tempo de retenção (Tr) x absorvância (λ) da partição diclorometânica do geoprópolis da *Melipona q. anthidioides* (1-10)

tR (min)	$\lambda_{\text{máx}} \text{CH}_2\text{CL}_2 \text{ A1}$	$\lambda_{\text{máx}} \text{CH}_2\text{CL}_2 \text{ A2}$	$\lambda_{\text{máx}} \text{CH}_2\text{CL}_2 \text{ A3}$	$\lambda_{\text{máx}} \text{CH}_2\text{CL}_2 \text{ A4}$	$\lambda_{\text{máx}} \text{CH}_2\text{CL}_2 \text{ A5}$	$\lambda_{\text{máx}} \text{CH}_2\text{CL}_2 \text{ A6}$	$\lambda_{\text{máx}} \text{CH}_2\text{CL}_2 \text{ A7}$	$\lambda_{\text{máx}} \text{CH}_2\text{CL}_2 \text{ A8}$	$\lambda_{\text{máx}} \text{CH}_2\text{CL}_2 \text{ A9}$	$\lambda_{\text{máx}} \text{CH}_2\text{CL}_2 \text{ A10}$
0,933	230.58	230.16	228.38	230.73	229,83-388.95	230.92	229.34-388.82	230.14	230.80	230.27
11,15	224.97-274.16		273.68				274.07			
12,97	230.76-308.34	229.30-308.36	308.23	232.05-308.84	308.90	308.39	308.49		235.46-308.51	308.42
16,92	230.27-290.14	223.54-290.14	290.53	231.39-290.13	237.78-290.58	290.28	233.83-290.49	237.09-289.91	235.62-290.45	290.05
18,44			251.92							
20,61		286.52	286.39	235.49-286.95	238.73-286.80	285.12	236,92-286,39	236.52-286.75	238.05-286.16	287.41
21,75				279.45						
22,39	276.13								276.10	
23,91			233.11-290.37	232.26-291.64	232.56-290.70					
24,21	232.84-290.65	227.64-290.97				234.51-290.61	232,24-290,76	232.02-290.33	232.55-290.81	233.15-290.67
24,85	241.17-289.55	238.97-289.40	241.59-289.34	241.45-290.00	241.70-289.40	242.15-289.31	241.69-289.53	241.52-289.33	241.43-289.46	242.12-289.31
25,85	255.11-356.28	230.38-291.45	232.21-291.02	233.19-293.07	255.21-356.96		233.02-292.59	231.73-290.77	255.00-356.75	232.61-291.09
25,91	233.77-294.77				232.28-291.46				232.18-291.46	239.92-289.31
26,84	235.20-287.48	236.55-288.87	240.55-287.72	240.14-290.94	238.34-289.30	239.10-288.37	238.50-289.65	238.86-289.12	238.46-288.24	
27,26	236.09-336.77	230.75-271.13-339.56	237.39-270.61-339.98	236.63-343.06	237.56-270.68-343.65	238.50-270.47-343.45	236.53-270.85-341.81	236,45-270,56-340,38	237.25-342.99	237.78-270.50-339.95
27,69	267.13-345.13	234.33-266.51-349.46	266.16-351.56	240.08-266.77-352.28	266.53-352.41	266.69-349.14	239.99-266.54-352.57	266.51-351.66	266.46-350.62	266.71-350.64
28,53	272.86-335.69	272.87-335.56	272.78-335.05	237.90-273.08-335.90	272.84-335.70	272.98-335.92	237.54-272.96-335.86	237.55-272.85-335.88	273.05-335.40	272.75-335.80
29,00	233.36-292.67	233.37-294.88	233.96-293.83	234.94-297.56	234.75-296.51	234.28-294.56	235.25-298.44	234,40-295,68	234.19-294.90	234.78-296.69
29,38	235.77-291.62	230.19-288.33	236.85-288.22	236.83-289.38	237.27-288.41	240.22-288.42	236.93-288.62	237.23-288,25	237.42-288.49	237.34-288.37
29,81	236.70-295.81	354.96	237.28-295.28	237.34-296.35	237.93-295.21	237.58-295.60	237.08-295.95	237.57-295.20	236.91-295.62	238.38-295.10
30,87	245.77-282.98	284.35	246.62-283.95	281.32	245.91-284.14	246.30-284.25	245.07-283.69	245.15-284.88	245.90-284.44	246.09-284.91
31,91	238.33-267.85-346.66	230.98-267.72-348.91	240.02-267.42-347.54	238.90-268.09-349.83	267.77-351.62	240.25-267.89-350.03	238.82-268.06-350.86	239.43-267.87-348.09	239.42-267.92-348.06	267.56-348.63

APÊNDICE J

Perfil químico - Tempo de retenção (Tr) x absorvância (λ) da partição hexânica do geoprópolis da *Melipona q. anthidioides* (1-10)

tR (min)	λ máx hexA1	λ máx hexA2	λ máx hexA3	λ máx hexA4	λ máx hexA5	tR (min)	λ máx hexA6	λ máx hexA7	λ máx hexA8	λ máx hexA9	tR (min)	λ máx hexA10
0,933	230.77	230.44-388.72	228.22-257.69-388.92-397.88	229.67-388.22	230.35	*	*	230.20-388.94	230.36-388.83	230.51	0,848	229.91-388.76
3,201						*	*					
11,193	246.13-324.06											
16,068	290.65											
19,927	283.56											
22,05										274.88	22,047	271.62
23,53	290.60											
24,29	244.14-289.00	246.33-288.53										
24,97	249.88-357.17	250.01			290.73							
25,48	290.59	290.58		290.21	291.02-389.73	*	*	290.22	223.94-228.68-289.41	289.37	25,693	288.71
26,41	243.00-287.57	246.90-287.53	248.83	289.04	289.21-389.63	*	*		228.22-287.90	287.08		
26,84	246.49-273.36	272,99	288.31					274.92			26,625	286.57
27,26	267.02-347.06	267.52										
27,69		267.93							221.13-267.94-345.38		27,517	267.21
28,32	268.14-341.11	268.18				28,533	285.88	288.14	275.95-297.73-338.42-396.91			
28,96	245.26-288.17	288.38		226.01-288.57	288.63				228.26-288.44	288.34	28,83	288.53
29,38	288.66	288.36		288.91	289.38			287.04	229.01-289.44-329.77-389.35	287.21	29,552	286.05
30,87	249.40-271.26				289.20						29,89	287.06
31,077			257.83									
31,91	267.57-348.07	267.46-347.84	267.19	267.86-347.82	268.24-350.55			267.47-352.13	268.17-344.38	267.77-346.69	31,543	267.55-346.18
33,325		266.20	268.46	265.02-347.27					264.78-347.94	265.89	33,367	266.04
38,181										258.17-297.37-370.68-391.16	38,073	257.93
38,878			257.09			38,878	290.49	258.83-310.50	254.40	255.43	38,922	256.81
39,07				253.95	254.42							

APÊNDICE K

Perfil químico - Tempo de retenção (Tr) x Área (%) /do extrato etanólico do geoprópolis da *Melipona q. anthidioides* (1-10)

tR (min)	área A1	% A1	área A2	%A2	área A3	% A3	área A4	% A4	área A5	% A5	área A6	% A6	área A7	% A7	área A8	% área	área A9	% área	área A10	% área
0,93	4308	3,72	1331	1,50	3363	2,50	2748	3,35	45,7	0,16	1033	1,27	1067	1,44	457	0,46	2367	2,72	900	0,98
2,46	2073	1,79	822	0,93			909	1,11	213	0,77							3014	3,46		
9,50					4299	3,19	2520	3,07												
12,97	6217	5,36	2378	2,68	3255	2,42	3325	4,05	757	2,72	1693	2,08					2853	3,28		
16,07	3908	3,37			4908	3,65	3338	4,07	5666	20,37	1526	1,88	1532	2,07			1578	1,81	1551	1,69
16,92	6231	5,37	2856	3,22	4763	3,54	4145	5,05	1408	5,06	2639	3,24	2832	3,83	1435	1,43	2972	3,41	2209	2,40
18,44	6289	5,42			5282	3,92	3851	4,70	1217	4,38	2644	3,25	2298	3,11	450	0,45	2679	3,08		
20,61	2688	2,32	2647	2,99	5006	3,72	2533	3,09	1136	4,09	2176	2,68			1865	1,86	2111	2,42	2580	2,80
22,05	7230	6,24	3480	3,93	5737	4,26	5473	6,67	1610	5,79	3010	3,70	3319	4,49	1552	1,55	3218	3,69	3611	3,93
22,85	2119	1,83													359	0,36	761	0,87		
24,21	6624	5,71	6137	6,93	7920	5,88	4862	5,93	1608	5,78	4966	6,11	4392	5,94	5681	5,67	5141	5,90	5915	6,43
24,85	6873	5,93	7489	8,45	12123	9,01	5462	6,66	1799	6,47	7126	8,76	5966	8,07	9526	9,50	7531	8,65	8362	9,09
25,86	3128	2,70	3456	3,90	5567	4,14	2455	2,99	1006	3,62	2983	3,67	2272	3,07	4401	4,39	6329	7,27	4052	4,41
25,91	11583	9,99	6832	7,71	8290	6,16	6086	7,42	1484	5,34	5442	6,69	6604	8,93	5490	5,48	325	0,37	5382	5,85
26,84	6692	5,77	9111	10,28	11854	8,81	5998	7,31	1875	6,74	8283	10,18	7522	10,17	13025	13,00	7980	9,16	11330	12,32
27,26	5518	4,76	5801	6,55	7567	5,62	3534	4,31	1196	4,30	5450	6,70	4745	6,42	7856	7,84	5165	5,93	6307	6,86
27,69	10132	8,74	10805	12,20	13471	10,01	6816	8,31	2248	8,08	8924	10,97	3987	5,39	13406	13,38	8282	9,51	11934	12,97
28,53	2660	2,29	2545	2,87	2920	2,17	1771	2,16	549	1,97	2289	2,81	2570	3,47	3131	3,12	2254	2,59	254	0,28
29,00	7901	6,82	11538	13,02	13830	10,27	8945	10,91			10463	12,86	11444	15,47	15309	15,27	10861	12,47	14272	15,52
29,38	2676	2,31	2398	2,71	3443	2,56	1872	2,28	2128	7,65	2506	3,08	3306	4,47	3399	3,39	2608	2,99	2958	3,22
29,81	4675	4,03	3028	3,42	3491	2,59	2961	3,61	552	1,98	2836	3,49	3818	5,16	2603	2,60	3091	3,55	2241	2,44
30,87															1157	1,15	423	0,49	,	
31,91	6410	5,53	5941	6,71	7524	5,59	2414	2,94	1312	4,72	5347	6,57	6292	8,51	9128	9,11	5559	6,38	6905	7,51

APÊNDICE L

Perfil químico - Tempo de retenção (Tr) x Área (mAU*sec) / % da partição diclorometânica do geoprópolis da *Melipona q. anthidioides* (1-10)

tR (min)	área A1	% A1	área A2	%A2	área A3	%A3	área A4	%A4	área A5	%A5	área A6	%A6	área A7	%A7	área A8	%A8	área A9	%A9	área A10	%A10
0,933	529	0,59	221	0,22	231	0,23	498	0,35	322	0,35	332	0,42	413	0,38	267	0,30	442	0,49	240	0,24
11,15	2987	3,32			670	0,66							1573	1,44						
12,97	3164	3,52	1665	1,68	1200	1,17	2212	1,58	890	0,97	907	1,15	1205	1,10			1400	1,56	904	0,92
16,92	2651	2,95	1768	1,78	1594	1,56	3479	2,48	1365	1,49	1435	1,81	1769	1,62	1083	1,23	1585	1,77	1390	1,41
18,44					601	0,59														
20,61			1374	1,39	1459	1,43	2039	1,45	1113	1,22	1475	1,86	1193	1,09	1159	1,32	1227	1,37	1457	1,48
21,75							1820	1,30												
22,39	2623	2,92															1194	1,33		
23,91					4964	4,86	7018	5,00	4676	5,12										
24,21	2919	3,25	4854	4,90					4210	5,32	5088	4,66	3978	4,53	4156	4,64	5277	5,35		
24,85	2507	2,79	5687	5,74	7586	7,42	8014	5,71	5429	5,95	5299	6,70	5692	5,21	4969	5,66	5797	6,47	6187	6,28
25,85	1132	1,26	2562	2,59	2891	2,83	8100	5,77	2366	2,59			2117	1,94	2740	3,12	1982	2,21	3125	3,17
25,91	16957	18,86	9193	9,28	8097	7,92	14877	10,60	7515	8,23			11958	10,95	5669	6,46	8496	9,49	6398	6,49
26,84	7452	8,29	12059	12,17	12496	12,22	14536	10,36	12331	13,51	10642	13,45	12777	11,70	12084	13,77	10347	11,55	13194	13,38
27,26	4317	4,80	7224	7,29	7515	7,35	8794	6,27	7116	7,79	6579	8,31	7765	7,11	7042	8,03	6357	7,10	7456	7,56
27,69	8397	9,34	14036	14,16	13577	13,28	16804	11,98	12839	14,06	11354	14,35	13445	12,31	12384	14,12	10722	11,97	13965	14,16
28,53	2301	2,56	3211	3,24	3148	3,08	4169	2,97	2777	3,04	2873	3,63	3586	3,28	3398	3,87	2758	3,08	3231	3,28
29,00	13695	15,23	16671	16,82	17137	16,76	18956	13,51	16790	18,39	12251	15,48	18291	16,75	16156	18,41	15259	17,04	17697	17,95
29,38	2268	2,52	3952	3,99	5182	5,07	5641	4,02	3841	4,21	3781	4,78	5110	4,68	3653	4,16	3941	4,40	4301	4,36
29,81	5767	6,42	3531	3,56	3780	3,70	6986	4,98	2421	2,65	4105	5,19	5517	5,05	2418	2,76	4081	4,56	2615	2,65
30,87	1606	1,79	1462	1,48	1089	1,07	2702	1,93	604	0,66	1448	1,83	610	0,56	1126	1,28	570	0,64	1229	1,25
31,91	8624	9,59	9630	9,72	9008	8,81	13676	9,75	8911	9,76	12446	15,73	11073	10,14	9609	10,95	9253	10,33	9928	10,07

APÊNDICE N

Perfil químico - Tempo de retenção (Tr) x Área (m AU*sec) / % do resíduo (torta) da geoprópolis da *Melipona q. anthidioides* (1-10)

tR (min)	λmáx TORTA A1	λmáx TORTA A2	λmáx TORTA A3	λmáx TORTA A4	λmáx TORTA A5	λmáx TORTA A6	λmáx TORTA A7	tR (min)	λmáx TORTA A8	λmáx TORTA A9	λmáx TORTA A10
0,93	237.03-267.49	234.08-267.79	238.01-266.90	239.26-266.92	238.93-266.83	229.04	238.71-266.74	0,89	230.77-274.40	233.08-268.06	233.87-267.99
2,46	227.89-269.72	228.15-269.52	227.57-269.57	228.07-269.58	227.60-269.57	227.51-269.56	227.40-269.50			22.61-269.99	227.29-269.71
9,50	257.44-364.87	232.79-308.29	227.99-257.15-364.88	266.64	270.61	256.64-364.95	229.86-257.20-365.17				272.55
10,81		233.02-308.40		234.11-296.26	236.51-295.56						237.31-306.80
12,97	234.34-295.83	234.26-306.73		235.18-295.08	294.89	296.09	224.73-288.99			306.26	
13,91		234.66-296.55						13,017	308.84		
15,31	233.96-280.65		224.83-288.44	280.43	280.02	280.73					281.53
15,73	231.16-291.72		225.68-289.81		232.22-290.97						233.31-292.25
15,98	230.91-294.12	235.08-288.25		231.22-294.84	231.81-294.93	293.03	226.27-293.28	16,112	295.92	291.58	232.70-295.36
16,92	232.69-288.12	232.78-287.79	225.49-289.25	233.56-287.11	233.75-288.78	288.69	225.48-288.54	16,79	235.36-289.86	237.69-289.69	235.96-288.61
17,55			252.10-365.41								277.76
18,44	252.43-365.31	277.03		252.46-365.14	252.23-365.51	252.28-365.13	252.05-365.60			252.13-365.82	252.42-365.50
19,80			285.92								
20,18		235.71-285.86									
20,61	238.48-282.38			237.90-284.80	235.85-286.12	285.05	285.06	20,732	234.43-287.22	286.10	235.91-286.89
21,67		281.79	223.03-280.15		279.04						
22,05	279.00					280.61	223.60-279.49			280.13	279.48
22,85	282.20	290.52						22,217	282.12		
23,79		233.25-308.12	227.92-296.15	233.83-305.81	233.51-296.88						287.06
24,21	233.61-309.25		240.41-290.93	240.08-293.69			226.72-295.65	24,208	233.34-296.76	234.30-299.42	233.79-298.22
24,85	237.11-307.04	240.45-294.09	231.28-255.44-356.69	278.46	241.24-292.56	240.88-290.50	235.63-292.63	24,887	241.74-302.59	241.00-297.18	241.59-299.05
25,14		255.22-356.58		256.18-355.76	255.40-356.52	255.12-356.11	226.70-255.88-356.06	25,565	256.69-356.85	255.41-356.17	
25,86	265.84-354.40	235.35-293.14	224.13-289.76	235.77-290.71	235.23-290.84	288.37	225.79-290.01	25,862	269.13-291.82		256.05-356.51
25,91			296.64								236.12-291.90
26,24	236.15-297.12	238.27-297.04		239.16-295.69	241.55-294.98	296.02	295.28	26,287	240.33-298.34	235.10-291.97	238.83-297.15
26,54		241.04-286.48	234.36-286.80		241.55-286.85					238.83-297.15	240.87-296.90
26,84			227.48-332.57	241.70-285.59		242.58-286.11		26,88	241.64-288.35	238.11-285.47	240.24-286.01
27,26	236.04-295.91	236.53-327.16	229.63-265.75-348.92	236.92-295.63	237.36-337.03	239.56-337.58	239.56-337.58	27,303	236.54-270.46-339.15	241.33-286.52	241.69-287.20
27,69	237.63-284.13	287.83	225.30-269.59	287.05	266.63-344.72	268.64		27,728	266.85-347.81	236.50-297.72	237.04-270.85-335.24
28,28										238.63-267.84	267.06-342.66
28,53			287.51							241.85-283.63	
29,38		287.21		285.63	288.05	286.94		29,042	236.13-288.28	241.98-281.42	
29,81		238.95-294.92		238.27-294.79	239.35-295.08	240.56-295.07		29,467	240.35-292.26	239.98-294.27	287.76
30,23								29,89	238.48-295.82	237.92-296.00	238.79-295.45
30,87										241.62-285.33	
										243.60-283.71	

APÊNDICE O



LAYOUT da apresentação da embalagem primária e secundária do creme da geoprópolis da mandaçaia - IMAGEM MERAMENTE ILUSTRATIVA

Fonte: autor

APÊNDICE P



LAYOUT da apresentação da embalagem primária do creme à base do extrato da geoprópolis da mandaçaia - IMAGEM MERAMENTE ILUSTRATIVA

Fonte: autor

APÊNDICE Q



LAYOUT da apresentação da embalagem secundária do creme à base do extrato da geoprópolis da mandaçaiá - IMAGEM MERAMENTE ILUSTRATIVA

Fonte: autor

APÊNDICE R



LAYOUT da apresentação da embalagem primária e secundária do extrato etanólico da geoprópolis da mandaçaia - IMAGEM MERAMENTE ILUSTRATIVA

Fonte: autor

APÊNDICE S



LAYOUT da apresentação da embalagem secundária do extrato etanólico da geoprópolis da mandaçaia - IMAGEM MERAMENTE ILUSTRATIVA

Fonte: autor

APÊNDICE T

SUGESTÃO DE BULA PARA (EXTRATO DA GEOPRÓPOLIS)

INFORMAÇÕES AOS PACIENTES

IDENTIFICAÇÃO DO MEDICAMENTO:

Extrato hidro alcóolico da geoprópolis da abelha *Melipona quadrifasciata anthidioides*.

“Medicamento opoterápico registrado com base no uso tradicional.”

“Não é recomendado o uso por período prolongado enquanto estudos clínicos amplos sobre sua segurança não forem realizados.

APRESENTAÇÃO

Extrato seco mínimo de 15% (m/v)

Volume: 30ml; Contém: (1 dosador conta gotas)

Via de administração: uso interno e/ou externo

“USO ADULTO e PEDIÁTRICO acima de 2 anos”

COMPOSIÇÃO

Contém compostos fenólicos totais, flavonoides.

Ingredientes: geoprópolis e álcool de cereais

NÃO CONTÉM GLÚTEN

INFORMAÇÕES AO PACIENTE:

1-PARA QUE ESTE MEDICAMENTO É INDICADO?

Uso interno: Este medicamento é utilizado como promotor da saúde, antioxidante natural, estimulante do sistema imunológico. Uso em estados gripais, antisséptico bucal, tratar a dor de garganta e ajuda a tratar problemas respiratórios, incluindo a tosse irritativa ou com catarro.

Uso externo: pode ser utilizado para acelerar a regeneração dos tecidos, a cicatrização e desinfecção de feridas.

2-COMO ESTE MEDICAMENTO FUNCIONA?

Este produto atua na promoção da saúde, através de suas propriedades antioxidante e estimulante do sistema imunológico.

3 -QUANDO NÃO DEVO USAR ESTE MEDICAMENTO?

“Este produto é contraindicado à mulheres grávidas e à portadores de alergias aos componentes da fórmula”.

“Este medicamento é contraindicado para menores de 2 anos”

4- O QUE DEVO SABER ANTES DE USAR ESTE MEDICAMENTO?

É contraindicado o uso deste produto em mulheres grávidas por não possuir estudos de toxicidade em pacientes gestantes.

“Este produto contém substâncias que podem causar alergias.”. Recomenda-se antes do uso, pingar 2 gotas no braço e aguardar por 30 minutos, se houver irritação da pele, não utilizar este produto.

“Este produto contém ÁLCOOL.

“Informe ao seu médico ou cirurgião-dentista se você está fazendo uso de algum outro medicamento.

5. ONDE, COMO E POR QUANTO TEMPO POSSO GUARDAR ESTE MEDICAMENTO?

Guarde este produto em temperatura ambiente e ventilado: “Número de lote e datas de fabricação e validade: vide embalagem.”

“Não use medicamento com o prazo de validade vencido. Guarde-o em sua embalagem original.

“Todo medicamento deve ser mantido fora do alcance das crianças.

“Proteger da luz solar e de fontes de radiação eletromagnética, como por exemplo: forno de microondas, aparelho celular, televisão, etc.”

6. COMO DEVO USAR ESTE MEDICAMENTO?

Uso oral interno adulto: tomar 30 gotas diárias, em água, sucos ou leite. Em estados gripais tomar de 2 a 3x ao dia.

Uso oral interno crianças: tomar 5 gotas diárias em água, sucos ou leite

Uso externo: pingar de 2 a 3 gotas no ferimento e aguardar secagem.

8. QUAIS OS MALES QUE ESTE MEDICAMENTO PODE ME CAUSAR?

Este produto pode ocasionar reação alérgica aos componentes da fórmula. Em pacientes com histórico de alergias seu uso não é recomendado.

“Atenção: este produto é um medicamento novo e, embora as pesquisas tenham indicado eficácia e

segurança aceitáveis, mesmo que indicado e utilizado corretamente, podem ocorrer eventos adversos imprevisíveis ou desconhecidos. Nesse caso, informe seu médico ou cirurgião-dentista.

Apesar de alguns estudos já apresentarem atividades antioxidante e antimicrobiana para a geoprópolis de diversas espécies de abelhas sem ferrão, o número de trabalhos publicados ainda é pequeno e necessita de informações mais contundentes de pesquisas sobre a

utilização deste produto no tratamento das enfermidades relatadas.

Estas informações são baseadas em informações a respeito da utilização do extrato da própolis de *Apis mellifera*, porém de caráter ilustrativo e lúdico. Pois sabemos que a utilização desse tipo extrato da geoprópolis ainda não é permitido o registro no Brasil.

EXEMPLO

APÊNDICE U

SUGESTÃO DE BULA PARA (CREME À BASE DA GEOPRÓPOLIS)

INFORMAÇÕES AOS PACIENTES!

IDENTIFICAÇÃO DO MEDICAMENTO:

Creme à base do extrato da geoprópolis da abelha *Melipona quadrifasciata anthidioides*.

“Medicamento opoterápico **registrado com base no uso tradicional.**”

“Não é recomendado o uso por período prolongado enquanto estudos clínicos amplos sobre sua segurança não forem realizados.

APRESENTAÇÃO

Creme à base extrato geoprópolis 1,5%, 2,5% e 5,0%

Volume: 30g; Contém: (1 bisnaga)

Via de administração: uso externo

“**USO ADULTO e PEDIÁTRICO acima de 2 anos**”

COMPOSIÇÃO

Contém compostos fenólicos totais, flavonoides.

Ingredientes: extrato hidro alcoólico da geoprópolis, álcool graxo, alquil sulfato.

NÃO CONTÉM GLÚTEN

INFORMAÇÕES AO PACIENTE:

1-PARA QUE ESTE MEDICAMENTO É INDICADO?

Uso externo: pode ser utilizado para acelerar a regeneração dos tecidos, a cicatrização e desinfecção de feridas.

2 -COMO ESTE MEDICAMENTO FUNCIONA?

Este produto atua na promoção da saúde, cicatrização da pele através de suas propriedades antioxidante e antimicrobiana.

3 -QUANDO NÃO DEVO USAR ESTE MEDICAMENTO?

“Este produto é contraindicado a mulheres grávidas e à portadores de alergias aos componentes da fórmula”.

“Este medicamento é contraindicado para menores de 2 anos”

4- O QUE DEVO SABER ANTES DE USAR ESTE MEDICAMENTO?

É contraindicado o uso deste produto em mulheres grávidas por não possuir estudos de toxicidade em pacientes gestantes.

“Este produto contém substâncias que podem causar alergias.” Recomenda-se antes do uso, pingar 2 gotas no braço e aguardar por 30 minutos, se houver irritação da pele, não utilizar este produto.

“**Informe ao seu médico ou cirurgião-dentista se você está fazendo uso de algum outro medicamento.**”

5. ONDE, COMO E POR QUANTO TEMPO POSSO GUARDAR ESTE MEDICAMENTO?

Guarde este produto em temperatura ambiente e ventilado: “**Número de lote e datas de fabricação e validade: vide embalagem.**”

“Não use medicamento com o prazo de validade vencido. Guarde-o em sua embalagem original.

“**Todo medicamento deve ser mantido fora do alcance das crianças.**”

“**Proteger da luz solar e de fontes de radiação eletromagnética, como por exemplo: forno de microondas, aparelho celular, televisão, etc.**”

6. COMO DEVO USAR ESTE MEDICAMENTO?

Uso externo: espalhar uma pequena camada protetora no local desejado sobre a pele. Deve ser aplicada por adulto ou sob supervisão. Deve ser mantido fora do alcance de crianças.

8. QUAIS OS MALES QUE ESTE MEDICAMENTO PODE ME CAUSAR?

Este produto pode ocasionar reação alérgica aos componentes da fórmula. Em pacientes com histórico de alergias seu uso não é recomendado.

“Atenção: este produto é um medicamento novo e, embora as pesquisas tenham indicado eficácia e segurança aceitáveis, mesmo que indicado e utilizado corretamente, podem ocorrer eventos adversos imprevisíveis ou desconhecidos. Nesse caso, informe seu médico ou cirurgião-dentista.

Apesar de alguns estudos já apresentarem atividades antioxidante e antimicrobiana para a geoprópolis de diversas espécies de abelhas sem ferrão, o número de trabalhos publicados ainda é pequeno e necessita de informações mais contundentes de pesquisas sobre a

utilização deste produto no tratamento das enfermidades relatadas.

Estas informações são baseadas em revisões literárias que informam sobre a utilização de creme à base de extrato da própolis de *Apis mellifera* em diversas enfermidades. Assim de forma sugestiva de caráter ilustrativo e lúdico. Apresentamos estas informações sobre este tipo de produto. Pois sabemos que a utilização desse creme à base do extrato da geoprópolis ainda não é permitido o registro no Brasil.

EXEMPLO

APÊNDICE V

Microencapsulations of the geopropolis extract of *Melipona quadrifasciata anthidioides* using Pluronic Lecithin Organogel (PLO).

Ferreira, Rodrigo da Cruz¹; Mota, Milleno Dantas²; Chinalia, Fabio Alexandre³; Silva, Lidércia C. R. Cerqueira⁴

^{1,2,3,4} Postgraduate Program in Biotechnology of Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia, UFBA, Av. Dean Miguel Calmon s / n - Vale do Canela, Zip code

: 40.110-100, Salvador, Bahia, Brazil

INTRODUCTION

E-mail: ferreiradigo@yahoo.com.br

The geopropolis is a byproduct from the activity of stingless bees. It is a highly antioxidant product with antimicrobial characteristics. Therefore, it is used with therapeutic / prophylactic purposes by the natural medicine. Recent research is being carried out testing different pharmaceutical vehicles in order to improve its therapeutic performance. Pluronic® Lecithin Organogel (P.L.O.) is a phospholipid micro emulsion used in the preparation of drugs with the transdermal route of administration. This product improves skin permeability of a diverse range of drugs [1]. This work aims to prepare an organogel containing *Melipona quadrifasciata anthidioides* geopropolis extract (EGP) as the main bioactive substance.

METHODS

A pool of 10 samples of EGP from meliponary located at (latitude 12 ° 23'08 "S / longitude 38 ° 47'51" W) was used in Amélia Rodrigues-BA. After formulation describe in Table 1. The EGP was previously dissolved in an oily phase, which was poured into an aqueous phase with the assistance of an extrusion force. This was provided by two Lauer lock syringes connected by an adapter. (Figure 1). The contents of the two syringes were mixed, resulting on organogel. After the preparation, the pH was measured for 10 days with. Universalindikator (0-14) MERCK.

Table 1. Composition formulation

Phase	Components	Cc (m/v)
aqueous	Polaxamer	20%
	Purified water (lecithin solution)	q.sp. 100,0%
oil	(EGP)	22,0%
		5,0%

RESULTS

The liposome final product obtained a brownish coloration and a physical consistency compatible with a pharmaco gel, Figure 1. The formulation exhibited pH 6.0 shortly after the preparation. After 2 days a change to pH 5.0 was observed, which remained stable.



Figure 1: Detail of Lauer lock syringes connected / microcapsules contents of the geopropolis extract. Olympus optical model CX40RF100- Objetiva 100x.

DISCUSSION & CONCLUSIONS:

The pH (6.0-5.0) measured in the formulation is compatible with normal pH of the skin in men of (4.6 ± 0.3) and women (5.1 ± 0.4) [2]. These results corroborate with those reported in another study that recorded pH values of 5.5-6.3 for organogel containing propolis of *Apis mellifera*, which suggests a low risk for causing skin irritation [3]. Incorporation of active substances into liposomes is not a simple task. However the research demonstrated that EGP encapsulation in microvesicles is possible. Several other physical tests are required, such as: stability, spreadability, rheology, solubilization, permeability, viscosity and antimicrobial and antioxidant capacity tests of this micro-encapsulated product in order to guarantee new information and feasibility.

ACKNOWLEDGEMENTS: To CAPES and FAPESB for the financial support of the research.

REFERENCES

- [1] BEZERRA, S.S. OBTENÇÃO, Characterization and microbiological evaluation of a new pharmaceutical form with hidroquinone. Masters dissertation. Recife- PE, 2003.
- [2] LUEBBERDING S, KRUEGER N, KERSCHER M. Skin physiology in men and women: in vivo evaluation of 300 people including TEWL, SC hydration, sebum content and skin surface pH. *Int J Cosmet Sci*. Oct; 35; 477-83; 2013.
- [3] BALATA, G., HANAN M. EL N. S, SAHAR R. Propolis organogel as a novel topical delivery system for treating wounds. *Drug Deliv*, 21(1): 55-61; 2014.

APÊNDICE W



Published: 23 October 2020

Essential and Potentially Toxic Elements from Brazilian Geopropolis Produced by the Stingless Bee *Melipona quadrifasciata anthidioides* Using ICP OES

Rodrigo da Cruz Ferreira, Fernanda de Souza Dias, Caroline de Araújo Tannus, Filipe Barbosa Santana, Daniele Cristina Muniz Batista dos Santos, Fábio de Souza Dias, Marina Siqueira de Castro, Hugo Neves Brandão, Anibal de Freitas Santos Júnior [✉], Lidércia Cavalcanti Ribeiro Cerqueira e Silva & Fábio Alexandre Chinalia

Biological Trace Element Research **199**, 3527–3539 (2021) | [Cite this article](#)

205 Accesses | 1 Citations | [Metrics](#)

Abstract

Melipona quadrifasciata anthidioides is a species of stingless bee popularly known in Brazil as “mandioca”. Products derived from bees for food and therapeutic uses, have stimulated the evaluation of the chemical composition of geopropolis. Concentrations of 24 essential and potentially toxic elements were determined in geopropolis samples, using a sequential optical emission spectrometer with inductively coupled plasma (ICP OES) after microwave-assisted acid digestion. Principal component analysis (PCA) and Hierarchical cluster analysis (HCA) were used to carry out an exploratory analysis of the samples. The following elements were quantified (in mg Kg⁻¹): Al (320,414.40–36,911.1), As (<LoQ-4.37), Ba (38.36–211.11), Ca (672.38–94,527), Co (<LoQ-14.12), Cr (17.41–38.07), Cu (10.63–28.73), Fe (21,973.96–11,536.47), K (1974.38–9198.91), Mg (1961.17–7481.79), Mn (50.51–310.51), Na (154.55–340.46), Ni (2.28–21.74), P (16.59–51.07), Pb (3.45–8.55), Sb (<LoQ-1.64), Se (<LoQ-1.01), Sn (4.92–16.14), Sr (9.21–36.29), V (28.77–78.73) and Zn (24.34–50.31). Cd and Mo were found to be below the limit of detection (LoD) and quantification (LoQ) values of ICP OES in all investigated samples. Geopropolis can be a potential source of macro- and microelements for colonies and products derived from these bees for human consumption, contributing to their geographical origin and quality control, besides being an indicator of environmental monitoring.