



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ – *CAMPUS* DE CASCAVEL  
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS E FARMACÊUTICAS – CCMF  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS – PCF

**PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES, FOTOPROTETORAS E ANTIMICROBIANAS  
DE FORMULAÇÕES COSMÉTICAS COM APITOXINA.**

RHAYSA AKEMI TAKEDA SANTOS

CASCAVEL

2024

RHAYSA AKEMI TAKEDA SANTOS

**PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES, FOTOPROTETORAS E ANTIMICROBIANAS  
DE FORMULAÇÕES COSMÉTICAS COM APITOXINA.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Oeste do Paraná, *campus* de Cascavel, em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas na linha de pesquisa Prospecção de Microrganismos e Substâncias Bioativas com Aplicações Biotecnológicas e em Saúde.

Orientadora: Prof. Dra. Luciana Bill Mikito

CASCADEL - PR

2024

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Takeda Santos, Rhaysa Akemi  
PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES, FOTOPROTETORAS E  
ANTIMICROBIANAS DE FORMULAÇÕES COSMÉTICAS COM APITOXINA. /  
Rhaysa Akemi Takeda Santos; orientadora Luciana Bill Mikito.  
-- Cascavel, 2024.  
48 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico Campus de Cascavel) --  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências  
Médicas e Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Farmacêuticas, 2024.

1. Substâncias naturais com potenciais terapêuticos. I.  
Bill Mikito, Luciana, orient. II. Título.

RHAYSA AKEMI TAKEDA SANTOS

**PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES, FOTOPROTETORAS E ANTIMICROBIANAS  
DE FORMULAÇÕES COSMÉTICAS COM APITOXINA.**

Cascavel, 18 de setembro de 2024.

BANCA EXAMINADORA

---

Profª Drª Luciana Bill Mikito

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

---

Prof. Dr. Rafael Andrade Menolli

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

---

Profª Drª Gabriela Medeiros  
Univel Centro Universitário

## **BIOGRAFIA RESUMIDA**

Rhaysa Akemi Takeda Santos é nascida em Minas Novas em Minas Gerais, formou-se em Biomedicina pela Universidade Paranaense Campus Cascavel em 2020, ingressou no Mestrado em Ciências Farmacêuticas no ano de 2022 com o objetivo de desenvolver o projeto nomeado Propriedades Antioxidantes, Fotoprotetoras e Antimicrobianas de Formulações Cosméticas com Apitoxina.

## EPÍGRAFE

*“ Seja qual for a situação, há algo de que podemos ter certeza:  
até as ondas mais gigantescas sempre quebram para frente.”*

*(Nobuo Suzuki)*

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho a todas as pessoas que estiveram comigo durante essa jornada, que se mostraram como uma rede de apoio extraordinária, me permitiram concluir essa etapa com êxito e me ajudaram a crescer profissionalmente e pessoalmente.

## AGRADECIMENTOS

Agradecimento à agência CAPES que fomentou a bolsa de estudo para realização deste trabalho.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Luciana Bill, que aceitou o desafio para montar esse projeto, por ser uma orientadora compreensível, resolutiva, atenciosa e que me ensinou não só pela docência, mas também agregou muito a mim como pessoa.

Ao Laboratório de Alimentos da UNIOESTE que permitiu que realizássemos alguns dos testes, aos técnicos que me auxiliaram a utilizar os equipamentos necessários e disponibilizaram tempo para me acompanhar nessa jornada.

Ao Laboratório de Microbiologia da UNIOESTE onde pude conhecer colegas novos do mestrado que se disponibilizaram a me auxiliar nos testes de atividade antimicrobiana, em especial à aluna Mariangela e a Prof<sup>a</sup> Dra<sup>a</sup> Lilian, que cedeu o laboratório para realização dos testes.

Aos colegas de mestrado e iniciação científica, os quais compartilhei minhas alegrias e frustrações, que me ajudaram com palavras de motivação, tirando minhas dúvidas, me auxiliando na realização dos testes e da escrita do trabalho, e hoje, levo para minha vida como meus amigos. Em especial à aluna de Iniciação científica, Ana Clara, que me ajudou e apoiou em inúmeros momentos, tornando-se muito além que uma colega de laboratório, mas uma amiga para vida.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Gabriela Medeiros que me inseriu nessa jornada como mestranda e me ajudou de inúmeras formas para conquistar esse título, que além de inspiração também é uma grande amiga.

Ao Prof Dr. Ralpo, que me ajudou a dar o primeiro passo para esse projeto e do qual trago muitos ensinamentos da vida.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Luciana Fariña, que é uma pessoa incrível e de uma forma singular fez toda a diferença na minha jornada no mestrado. Me ensinou tanto em suas aulas e em todas as conversas que tivemos, além de todo o alto astral contagiante, me trouxe muitas reflexões as quais me tornavam uma pessoa melhor.

Ao Prof Dr. Rafael e Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> que abriram as portas do Laboratório de Imunologia e me ensinaram muito durante o período de disciplina, tanto sobre práticas laboratoriais, como escrita de trabalho.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Dalila por aceitar ser a banca da qualificação e defesa deste trabalho, bem como, todas as considerações, a fim de nos direcionar para a melhor direção.

À Apivel e o Rancho Bonato que cederam a Apitoxina para os testes.

Ao PCF que me aceitou como aluna regular de mestrado e me proporcionou a oportunidade de desenvolver e entregar esse trabalho. Em especial a Adriany, que

sempre tirou minhas dúvidas e me auxiliou em todos os momentos em que precisei da secretaria do programa.

À toda a banca, que aceitou estar presente na minha qualificação e defesa, sempre auxiliando a tornar esse projeto cada vez melhor e mais estruturado.

Ao meu namorado, Julio, que esteve ao meu lado durante essa trajetória, sendo meu ombro amigo e cedendo ouvidos, palavras e sorrisos. Me ajudou não só sendo meu companheiro, mas também se disponibilizou a me ajudar nas mais diversas atividades durante o projeto.

À minha família, que me apoiou infinitamente, permitindo que eu pudesse estudar e vencer.

Aos meus amigos de longa data, que se encheram de orgulho das minhas conquistas e em cada passo que eu dei durante toda minha trajetória de vida sempre me apoiaram a seguir em frente.

## RESUMO

A apitoxina, veneno das abelhas do gênero *Apis*, é um complexo de substâncias bioativas conhecidas por suas propriedades anti-inflamatórias, cicatrizantes, antioxidantes, fotoprotetoras e antimicrobianas. Este estudo desenvolveu e avaliou formulações cosméticas com diferentes concentrações de apitoxina (0,5%, 0,75% e 1%) para explorar seus potenciais efeitos terapêuticos e sua estabilidade. A apitoxina foi obtida em um apiário em Cascavel e mantida refrigerada até a preparação das formulações. Para a avaliação da estabilidade das formulações, seguiu-se as instruções do Guia de estabilidade de Cosméticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e realizados o teste de centrifugação, estresse térmico, avaliação organoléptica e avaliação físico-química. As formulações foram submetidas aos testes antimicrobianos por disco-difusão, avaliação da atividade fotoprotetora foi calculada pelo fator de proteção solar (FPS) obtido por meio da absorvância observada de cada amostra e por fim, avaliou-se a atividade antioxidante das amostras pelo método fotocolorimétrico utilizando o radical livre DPPH. As amostras contendo 0,5% e 0,75% de apitoxina apresentaram fatores de proteção solar (FPS) de 691 e 623, respectivamente, sugerindo um potencial de proteção contra radiação UVB. Na avaliação antimicrobiana, não foi observada atividade relevante das formulações contra cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. A eficácia antioxidante indicou um perfil promissor. Assim, a apitoxina mostra potencial como ingrediente ativo em cosméticos, especialmente por suas propriedades antioxidantes e de proteção UVB, ressaltando a importância dos ingredientes naturais devido ao menor risco de efeitos adversos e à sustentabilidade, alinhando-se às tendências de mercado e às regulamentações da ANVISA.

**Palavras-chave:** *Apis mellifera*, Cosméticos, Inovação, Fator de proteção solar, Produtos apícolas.

## ABSTRACT

Apitoxin, the venom of bees of the genus *Apis*, is a complex of bioactive substances known for their anti-inflammatory, healing, antioxidant, photoprotective and antimicrobial properties. This study developed and evaluated cosmetic formulations with different concentrations of apitoxin (0.5%, 0.75% and 1%) to explore their potential therapeutic effects and stability. The apitoxin was obtained from an apiary in Cascavel and kept refrigerated until the formulations were prepared. To evaluate the stability of the formulations, the instructions of the Cosmetic Stability Guide of the National Health Surveillance Agency (ANVISA) were followed and the centrifugation test, thermal stress, organoleptic evaluation and physicochemical evaluation were performed. The formulations were subjected to antimicrobial tests by disk diffusion, evaluation of the photoprotective activity was calculated by the sun protection factor (SPF) obtained through the observed absorbance of each sample and finally, the antioxidant activity of the samples was evaluated by the photocolometric method using the free radical DPPH. The samples containing 0.5% and 0.75% of apitoxin presented sun protection factors (SPF) of 691 and 623, respectively, suggesting a potential for protection against UVB radiation. In the antimicrobial evaluation, no relevant activity of the formulations against strains of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* was observed. The antioxidant efficacy indicated a promising profile. Thus, apitoxin shows potential as an active ingredient in cosmetics, especially for its antioxidant and UVB protection properties, highlighting the importance of natural ingredients due to the lower risk of adverse effects and sustainability, aligning with market trends and ANVISA regulations.

**Key-words:** *Apis mellifera*, Cosmetics, Innovation, Sun protection factor, Bee products.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Formulações teste de creme cosmético com acréscimo de apitoxina .....	23
Tabela 2 Antibiótico utilizados com controle positivo para cada cepa testada .....	26
Tabela 3 Relação do do $EE(\lambda) \times I(\lambda)$ para os comprimentos de onda de 290nm a 320nm .....	26
Tabela 4 Resultado médio e desvio padrão da análise, em triplicata, de pH de amostras de creme cosmético a base de apitoxina .....	29
Tabela 5 Medidas do diâmetro dos halos formados nas placas semeadas com E. coli. ....	32
Tabela 6 : Medidas do diâmetro dos halos formados nas placas semeadas com S. aureus. ....	32
Tabela 7 Medidas do diâmetro dos halos formados nas placas semeadas com P. aeruginosa.....	33
Tabela 8 Cálculo de FPS da amostra FC.....	35
Tabela 9 Cálculo de FPS da amostra F1.....	35
Tabela 10 Cálculo de FPS da amostra F2 .....	36
Tabela 11 Cálculo de FPS da amostra F3.....	36
Tabela 12 Resultado médio e desvio padrão da absorbância encontrada das leituras realizadas em triplicata.....	38
Tabela 13 : Resultados em porcentagem do valor obtido para atividade antioxidante por meio do cálculo da equação 2.....	38

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Extração da apitoxina pelo estímulo elétrico.....	22
Figura 2 Formulações envasadas em potes vedados.....	24
Figura 3 Formulações após teste de centrifugação.....	28
Figura 4 Gráfico de análise de variância do teste de pH comparando valores de média e variância.....	30
Figura 5: Gráfico obtido pelo teste de tukey comparando valores de média entre os pares. ....	30
Figura 6 Placas de disco-difusão semeadas com E. coli.....	31
Figura 7 Placas de disco-difusão semeadas com S. aureus. ....	32
Figura 8 Placas de disco-difusão semeadas com P. aeruginosa .....	33
Figura 9 Gráfico de leitura das amostras FC, F1, F2 e F3.....	34
Figura 10 Análise de variância obtida pela média da leitura da atividade fotoprotetora. ....	37
Figura 11 Resultados obtidos pelo teste de tukey comparando a média entre os pares. ....	38
Figura 12 Análise de variância da leitura das amostras quanto a atividade antioxidante. ....	40
Figura 13 Resultados obtidos pelo teste de tukey comparando a média entre os pares. ....	41

## SUMÁRIO

<b>1.INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>13</b>
<b>3.1 ABELHA <i>Apis mellifera</i> E APICULTURA</b> .....	<b>13</b>
3.1.1 APITOXINA .....	14
3.1.2 APITERAPIA .....	15
3.1.3 COLETA DE APITOXINA .....	15
<b>3.2 PROPRIEDADES TERAPÊUTICAS DA APITOXINA</b> .....	<b>15</b>
3.2.2. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	17
3.2.3. ATIVIDADE FOTOPROTETORA.....	18
3.2.4. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA .....	19
<b>3.3. DESENVOLVIMENTO E ESTABILIDADE DE COSMÉTICOS NATURAIS</b> .....	<b>19</b>
<b>3.4 COSMÉTICOS COM APITOXINA E POSSÍVEIS EFEITOS ADVERSOS</b> .....	<b>20</b>
<b>4.OBJETIVOS</b> .....	<b>21</b>
4.1. OBJETIVO GERAL .....	21
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
<b>5. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>21</b>
5.1 OBTENÇÃO DE APITOXINA.....	21
5.2 DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES .....	22
5.2.1. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE PRELIMINAR.....	23
5.2.1.1 TESTE DE CENTRIFUGAÇÃO .....	23
5.2.1.2 ESTRESSE TÉRMICO .....	23
5.2.1.3. AVALIAÇÃO ORGANOLÉPTICA.....	24
5.2.1.4. AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA .....	24
<b>5.3 AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES TERAPÊUTICAS</b> .....	<b>25</b>
5.3.1 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA POR DISCO-DIFUSÃO.....	25
5.3.3 ATIVIDADE FOTOPROTETORA.....	26
5.3.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	27
5.3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	27
<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>28</b>
6.1 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE PRELIMINAR.....	28
6.2 AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA .....	29
6.2.1 ANÁLISE ESTÁTISTICA .....	30
<b>6.3 AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADE TERAPÊUTICAS</b> .....	<b>31</b>
6.3.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA POR DISCO- DIFUSÃO .....	31
6.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FOTOPROTETORA.....	34

6.4.1 CÁLCULO DO FATOR DE PROTEÇÃO SOLAR.....	35
6.4.2 ANÁLISE ESTÁTISTICA .....	37
6.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	38
6.5.1 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	40
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>41</b>
<b>8. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>42</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A busca por substâncias bioativas com potencial de aplicação em saúde é amplamente estudada na literatura, visando a utilização de complexos naturais que promovam atividades biológicas para uso terapêutico e tratamentos estéticos. Um dos produtos da apicultura é a apitoxina, o veneno da abelha com ferrão.

A apitoxina, veneno utilizado como defesa pelas abelhas *Apis Mellifera* é uma substância líquida transparente, com cheiro característico, apresenta um amargor, caracterizada como uma substância complexa, apresenta atividades biológicas comprovadas, sendo largamente citada sua atividade hemolítica, citotóxica, anti-inflamatória e ação anti-tumoral (TERRA, 2006).

A apitoxina ainda não é um produto apícola muito explorado, devido à dificuldade de coleta e, ainda fornecer quantidades muito pequenas. Os benefícios da apitoxina são extensos, tendo estudos voltados para sua atividade antiartrítica, analgésica, anti-inflamatória, antitumoral, entre outras, sendo assim, as aplicabilidades farmacêuticas são vastas e amplamente estudadas.

A apamina, substância constituinte da apitoxina, representa cerca de 2% do peso seco da apitoxina é considerada a menor neurotoxina conhecida, é uma molécula estável que age bloqueando inibidores da ação pós-sináptica. Ambas as substâncias, melitina e apamina, apresentam atividades biológicas comprovadas (PICOLI *et al.*, 2017).

Demonstrando amplo potencial na aplicação como agente terapêutico devido às suas atividades biológicas comprovadas, tendo sucesso na aplicação de tratamento de doenças reumáticas, ação analgésica, anti-inflamatória, cicatrizante, antitumoral e neuroprotetora, a apitoxina e seus componentes já demonstraram efeitos positivos comprovados no tratamento de doenças, ampliando as perspectivas para novos estudos para a aplicação na saúde e na estética, considerando que o uso de complexos naturais na manipulação de novos produtos terapêuticos pode potencialmente reduzir efeitos adversos, além de serem matérias-primas economicamente sustentáveis (ABRANTES, 2015).

## 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 3.1 ABELHA *Apis mellifera* E APICULTURA

O gênero *Apis* pertence ao reino: Animalia, ao filo: Arthropoda, a classe: Insecta ou Hexapoda, a subclasse: *Pterygota*, a ordem: *Hymenoptera*, a subordem: *Apocrita*, a família: *Apidae* e a tribo: *Apni*, existindo uma variedade de espécies de *Apis* (MICHENER, 2007).

Em comparação às outros gêneros de abelha, as abelhas do gênero *Apis* são as mais conhecidas, apresentando nove espécies: *Apis mellifera*, *Apis florea*, *Apis dorsata*, *Apis cerana*, *Apis korchevniskov*, *Apis andreniformis*, *Apis laboriosa*, *Apis nuluensis* e *Apis nigrocincta*. Dentre elas, a *Apis mellifera* sempre despertou interesse

devido a sua grande importância econômica e, sobretudo, pelas novas possibilidades de usos de seus produtos na área médica (VIANA, 2015).

Registros arqueológicos demonstram que as abelhas existem há pelo menos 42 milhões de anos, sendo possível discorrer sobre práticas de apicultura e apiterapia por povos na idade média. As abelhas *Apis mellifera* foram introduzidas por jesuítas europeus, que vieram ao Brasil para catequizar os povos indígenas, sendo sua característica mais marcante a presença de ferrão. São abelhas agressivas e sua agressividade no início causou grande impacto, fazendo muitos apicultores abandonarem suas atividades e somente nos anos 70 com a introdução de novas técnicas para manejo de abelhas-com-ferrão, a apicultura teve sua expansão consagrada no Brasil (DE ALMEIDA, 2017).

A apicultura é uma atividade considerada adequada ao desenvolvimento sustentável pois, auxilia na restauração do meio ambiente e promove renda complementar aos apicultores, caracterizando-se assim como uma prática de grande valor econômico. Além de promover um importante papel social, sustentável e ecológico, a apicultura é a criação de abelhas-com-ferrão com o intuito da obtenção de seus produtos como o mel, própolis geleia-real e apitoxina. É uma atividade de baixo custo de investimento e de manutenção que permite também associação a qualquer outra atividade agropecuária além de corroborar com o aumento da produtividade de colheita (DOS SANTOS e DE SOUZA RIBEIRO, 2009).

Os produtos provenientes das práticas de apicultura constituem uma das mais importantes contribuições para a civilização e desenvolvimento humano. Dentre eles, destaca-se o mel, amplamente utilizado como alimento, por ser um carboidrato complexo, fornece energia e outros benefícios cientificamente comprovados, como suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, além de contribuir de maneira incisiva economicamente, sendo o produto apícola mais comercializado. No entanto o produto apícola mais intrigante, certamente é o veneno da abelha *apis*, nomeado de apitoxina (LEITE e ROCHA, 2005).

Além de promover potenciais usos terapêuticos, os produtos apícolas também representam ótimo investimento econômico observando o quadro mundial representado pela apicultura brasileira (KUNITZ, 2015).

### 3.1.1 APITOXINA

O veneno da abelha *Apis*, conhecido como apitoxina, possui como primordial objetivo a proteção da colmeia contra uma diversidade de predadores e é caracterizada como uma substância de alto nível de complexidade, sendo em sua maioria composta pela melitina e uma menor fração representada pela fosfolipase A2, apamina, hialuronidase, adolapina e peptídeos MDC e apresenta na forma líquida, transparente, com odor característico, gosto amargo, com pH ligeiramente ácido em torno de 4,5 a 5,5 (ABRANTES, 2015).

Dentre os componentes presentes na apitoxina, destacam-se a melitina, que representa 50% do peso seco total do veneno, e a fosfolipase A2, uma enzima glicoproteica que catalisa a hidrólise de fosfolípídeos presentes na membrana celular, sua composição se caracteriza sendo 88% água, e os 12% restante se divide sendo 50-60% peptídeos grandes, como a melitina, a apamina, o peptídeo MCD, a secapina e a procamina, 15% enzimas, como a fosfolipase A2 e a hialuronidase e pequenas moléculas (DANTAS *et al.*, 2013).

### 3.1.2 APITERAPIA

Dentro do espectro da medicina alternativa está a apiterapia, que se refere ao uso terapêutico do veneno da abelha *Apis mellifera*, sendo aplicada por duas vias de administração: a chamada apipuntura, que utiliza o ferrão da abelha viva para aplicar no paciente para tratamento de artrites e doenças dermatológicas, e a apitoxina extraída aplicada por injeção intradérmica, procedimento este que só pode ser realizado por médicos e o paciente deve ser monitorado caso haja algum efeito adverso (GOKULAKRISHNAA, 2020).

O uso da apiterapia como aplicação terapêutica alternativa mostrou-se uma forma eficaz de tratamento para diversas patologias, principalmente na aplicação frente a doenças de natureza autoimune em função dos vários princípios ativos componentes da apitoxina, dando ênfase nas substâncias com alto potencial de ação anti-inflamatória como a melitina (KUMAR, 2022).

A apiterapia é uma forma terapêutica que visa tratar sintomas e dar assistência no tratamento de doenças, pode-se citar como exemplo a utilização da apitoxina no tratamento de esclerose múltipla, uma doença degenerativa causada por lesões nos nervos, incapacitando a comunicação entre cérebro e corpo. Acredita-se que a apitoxina induza uma resposta sistemática no organismo estimulando moduladores anti-inflamatórios e mitigando efeitos adversos. Outro exemplo seria a aplicação frente a artrite, estimulando a produção de cortisol e outros esteroides a fim de aliviar as dores (NASCIMENTO et al, 2021).

### 3.1.3 COLETA DE APITOXINA

Considerando os possíveis benefícios da apitoxina, bem como seu potencial de aplicação no tratamento de diversas doenças, foram desenvolvidos métodos para realizar a coleta do veneno de abelha de modo a utilizá-lo causando mínimo de danos ao inseto, uma vez que, após ferroadar, as operárias perdem uma parte do corpo e eventualmente morrem (SILVA, 2019).

O método de coleta da apitoxina foi desenvolvido em 1988, método que permite a coleta do veneno de até 10 colmeias, sendo realizado com um coletor que contém uma parte elétrica e outra parte sendo uma placa de vidro. A descarga elétrica é realizada quando as abelhas pousam sobre a placa de vidro culminando na reação de defesa dos insetos que picam a placa de vidro depositando o veneno, perdendo seus óleos voláteis e aderindo a placa, sob a forma de pó de cor marfim, após desligado o dispositivo, a apitoxina pode ser raspada da placa e armazenada em pote protegido da luz e em congelador (SILVA, 2019).

O método de coleta supracitado apresenta o benefício de que não provoca a morte do inseto e preserva o ferrão da abelha. Estima-se que em uma ferroadar neste método de coleta, a abelha operária libere cerca de 1 µg do veneno, sendo necessárias cerca de 10.000 abelhas para coleta de 1g da toxina (VIANA, 2015).

## 3.2 PROPRIEDADES TERAPÊUTICAS DA APITOXINA

A ampla busca de novas substâncias com potencial em aplicação em saúde atraiu muitos olhares e estudos para a apitoxina. A toxina de animais peçonhentos possui substâncias que podem ser empregadas em uma ampla variedade de fármacos, associado a isso, o veneno da abelha *Apis mellifera* se enquadra como uma proposta de produto diferenciado para aplicação na indústria farmacêutica, bem como seu alto valor de comercialização como produto apícola também atrai o interesse da comunidade agrícola (DANTAS *et al*, 2013).

A melitina principal composto proteico da apitoxina, representa cerca de 50% do peso seco do veneno, possui pH altamente básico, além de demonstrar grande poder bactericida e propriedades citotóxicas. Além disso, a melitina também demonstrou efeito analgésico significativo, ação antiviral e antitumoral (VIANA, 2015). De acordo com a literatura, a melitina apresenta forte atividade hemolítica, sendo seu efeito biológico mais característico, não se restringindo apenas a células animais, pois a substância também apresenta poderosa ação antifúngica e antibacteriana (PICOLI, 2016).

A apamina, também presente na apitoxina, é a menor neurotoxina conhecida, age nas membranas pós-sinápticas do sistema nervoso central e periférico, impossibilitando a transmissão de alguns impulsos inibitórios (PICOLI, 2016). Foi caracterizada por Habermann (1984) como uma molécula estável que apresentou efeitos supostamente de origens espinhal em suas cobaias. Picoli *et al.* em 2016 testou a apamina associada a melitina frente ao vírus da diarreia viral bovina e obteve resultados satisfatórios de atividade antiviral e virucida com a associação.

A fosfolipase A2, importante enzima glicoproteica da apitoxina, apresenta ação catalizadora na hidrólise de fosfolípidos presentes na bicamada lipídica das membranas celulares desencadeando reações inflamatórias, sua interação com a melitina pode ser a explicação da toxicidade difundida do veneno (VIANA, 2015).

Ainda há outros componentes como: polipeptídeos degranulador de mastócitos (MCD) capaz de liberar histamina endógena; hialuronidase, uma enzima despolimerizadora de ácido hialurônico, tornando as células ainda mais permeáveis; dopamina, um neurotransmissor capaz de promover aumento da atividade motora e adolapina, também um neurotransmissor capaz de promover efeito analgésico (PICOLI *et al.*, 2016).

A inflamação pode ser caracterizada como uma complexa reação de defesa de um organismo, de forma não específica, frente a agentes nocivos, físicos, químicos ou biológicos. A reação inflamatória possui alguns sintomas clássicos, que são: aumento do fluxo sanguíneo (rubor); vasodilatação do local (calor), acúmulo e circulação de fluido edema; dor e perda de função, cujo efeitos são causados pela liberação de receptores químicos, podendo ocorrer de forma aguda ou crônica (BOCHNIE, 2016).

Classificada como uma substância com alto potencial anti-inflamatório não esteroide, a apitoxina vem sendo aplicada em tratamentos de doenças como a artrite, reumatismos e outras doenças de cunho autoimune. A literatura expôs recentemente outras propriedades benéficas da apitoxina em base de estudos *in vivo*, como exemplo efeitos de radioproteção, antimutagênico, anticancerígenos, anti-neuroinflamatórios e hipoglicemiante (DE BRITO, 2018).

A atuação da apitoxina foi estudada como uma terapia complementar juntamente com a fisioterapia de pacientes com artrite reumatoide, os achados mostraram efeitos analgésicos, anti-inflamatórios e reparação tissular, prevenindo sequelas e objetivando melhoria funcional na associação da apiterapia com a fisioterapia de reabilitação, enfatizando que a apitoxina como terapia alternativa é

complementar da fisioterapia, ao mesmo tempo que sugere novos estudos para estabelecer sua eficácia e benefício a longo prazo (TOBAR et al., 2010)

Duas substâncias importantes componentes da apitoxina, a melitina e apamina apresentam elevada atividade anti-inflamatória, por atuarem inibindo a transcrição gênica da fosfolipase A2, além da inibição da COX-2, sendo a principal ciclooxygenase inflamatória, a apamina, então, promove ação sobre a hipófise anterior e estimulando a liberação do hormônio adrenocorticotrófico, que é responsável por estimular a produção e liberação do cortisol, anti-inflamatório endógeno, pela glândula adrenal (DANTAS et al, 2013).

### 3.2.2. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os radicais livres são continuamente produzidos durante os processos metabólicos atuando como mediadores para transferência de elétrons em diversas reações bioquímicas, sendo a oxidação um processo metabólico que projeta a produção de energia necessária para as atividades essenciais celulares e o metabolismo normal do corpo produzem compostos oxidantes, que se não controlados, potencialmente provocam danos extensivos (ALVES *et al.*, 2010).

É muito explorado na literatura que antioxidantes são altamente eficazes no combate contra esses radicais livres, bem como, já fora comprovado em estudos prévios que grande variedade de plantas e complexos naturais possuem o potencial bioativo de atividade antioxidante (LIMA *et al.*, 2006).

O radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil DPPH é amplamente utilizado com a finalidade de estabelecer a toxicidade de novos produtos naturais, é um cromóforo extremamente estável, apresentando uma banda de absorção no comprimento de onda de 515nm em meio alcoólico, possuindo uma coloração violeta intensa, é usado para avaliar a capacidade sequestradora e antioxidante de produtos naturais e apícolas com potencial bioativo (VIANA, 2019).

A própolis, outro produto apícola bastante difundido, é objeto de muitos estudos científicos pelas suas atividades biológicas elevadas, com uma composição rica em derivados do ácido p-cumárico, polifenol que possui propriedades biológicas e farmacológicas como efeito antioxidante, efeito quimioprotetor, antimicrobiano entre outros (COELHO, 2013).

O mel se destaca pelo seu valor energético e nutricional, sendo um importante produto apícola comercial, pode ser considerado como um suplemento alimentar para desempenhar um efeito antioxidante devido a presença de compostos fenólicos como ácido gálico e quercetina, flavonóides, ácido ascórbico e  $\beta$ -caroteno (RAMALHO, 2018).

A apitoxina também é estudada quanto ao seu potencial antioxidante devido a sua complexidade, demonstrando-se uma substância com princípios bioativos para uso em produtos farmacêuticos (VIANA *et al.*, 2021).

Atividades antioxidantes e anti-inflamatórias foram observadas em amostras de apitoxina em solução aquosa, porém não foi constatado correlação com os componentes isolados da apitoxina. Em concentrações menores ou mais elevadas, as atividades antioxidante e anti-inflamatória não são consideráveis, indicando que há concentrações específicas de apitoxina em que os compostos se mostram mais ativos, evidenciando uma capacidade anti-inflamatória e antioxidante (SOBRAL et al. 2017).

### 3.2.3. ATIVIDADE FOTOPROTETORA

O câncer no Brasil já é um grave problema de saúde pública, sendo o segundo lugar entre as principais causas de mortes nas Américas. Consoante ao melanoma ser o tipo de tumor maligno mais prevalente, representando 31,3% dos casos. É conhecido que a exposição excessiva à radiação ultravioleta, ainda mais sem proteção, pode colaborar com o surgimento dos tipos mais comuns de câncer de pele, dado que quanto maior a exposição solar, maiores as possibilidades de danos celulares (MOTA, 2023).

A principal responsável pela causa de enfermidades de pele, os raios ultravioletas (UV) são um tipo de radiação eletromagnética com um comprimento de onda mais curto que a luz visível, porém mais longos que os raios-X, são emitidos pelo sol e por outras fontes naturais e artificiais, como alguns tipos de lâmpadas. São visíveis pelo olho humano e podem agir diretamente na pele. A necessidade de proteger a pele de queimaduras solares surgiu há milênios e fora evoluindo ao que se conhece hoje como filtro solar ou protetor solar. São substâncias de uso tópico na pele que atuam contra a ação dos raios UV do sol (FLOR *et al.*, 2007).

Além disso, os filtros solares também podem ser classificados como uma manipulação cosmética que possui agentes fotoprotetores em sua composição, que tem como objetivo reduzir os efeitos danosos dos raios UV por meio da absorvência, reflexão ou difusão dos mesmos (MOTA, 2023).

As pesquisas por novos agentes fotoprotetores enquanto produtos naturais têm sido amplamente considerados por atuarem, sequestrando radicais livres gerados por cromóforos epidermais lesionados pela radiação UV e exercer assim efeitos inibitórios em lesões celulares e moleculares. A apitoxina ainda não tem estudos consolidados enquanto sua capacidade foto protetora, porém Viana e colaboradores (2019), desenvolveram uma formulação para determinação do Fator de Proteção Solar (FPS) *in vitro* do gel a base de apitoxina e obtiveram resultados que evidenciam a capacidade da apitoxina de proteger a pele irradiada por uma lâmpada ultravioleta UVB, sendo a apitoxina uma substância natural com potencial atividade fotoprotetora.

O Fator de Proteção Solar (FPS) é uma propriedade presente em substâncias capazes de absorver radiação em uma faixa específica de comprimento de onda (SILVA *et al.* 2015), pode ser determinado por meio da leitura em espectrofotômetro das soluções diluídas, esse método é conhecido como Método de Mansur e foi descrito em 1986. A leitura é realizada nos comprimentos de onda de 200nm a 400nm e depois submetidas ao cálculo matemático por meio da determinação da absorvência ou transmitância (VELASCO *et al.* 2011).

De acordo com a Lei de Lambert-Beer (1760) a transmitância refere-se a quantidade de luz que consegue transpor um elemento e a absorvência refere-se à quantidade de luz absorvida por um material.

Para determinar se uma substância pode ser considerada filtro solar dentro dos parâmetros da FDA (*Food and Drug Administration*) e da COLIPA (*European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association*), são avaliados a radiação UVB (290-320nm) e radiação UVA (320-400nm), sendo a radiação UVB de energia elevada causando danos imediatos pela radiação solar e a radiação UVA responsável por alterações celulares, abrangendo principalmente fibroblastos e melanócitos, em razão da elevada penetrabilidade da pele (VELASCO *et al.*, 2011).

### 3.2.4. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

O potencial farmacológico do veneno de abelha teve eficiência biológica comprovada para diversos usos terapêuticos, apesar de ainda não ter muitos estudos consolidados acerca da sua atividade antimicrobiana, Siqueira e colaboradores (2023) avaliaram a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) e os resultados demonstraram que a apitoxina apresentou atividade antifúngica, sendo capaz de inibir o crescimento de cepas de *Cryptococcus neoformans*, conhecido como um dos agentes mais comuns causadores da criptococose, uma CIM de 8 µg.mL<sup>-1</sup>.

Avaliou-se a ação da própolis, apitoxina e melitina sobre os fatores de virulência de *Staphylococcus aureus*, seus resultados mostraram que a apitoxina, tanto isolada como de forma combinada com a melitina, apresentaram grandes atividades inibidoras frente a *Staphylococcus aureus* resistentes à Meticilina (MSRA), além de sinergismos com efeitos bactericidas (PEREIRA, 2017).

Sendo um dos componentes mais importantes da apitoxina, a fosfolipase A2 demonstrou alta atividade catalítica, potencial imunogênico, atividade antibacteriana e anticoagulante além de desempenhar um papel ativo na geração de mediadores químicos, gerando contração muscular e desencadeando processos antiinflamatórios. É uma enzima de baixo peso molecular e está presente em diversas toxinas de animais peçonhentos (NEVALAINEN *et al.*, 2008).

O efeito antibacteriano da apitoxina se mostrou eficiente tanto frente bactérias gram-positivas como em bactérias gram-negativas. A fosfolipase A2, componente da apitoxina, se mostrou eficaz frente a cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella spp.*, demonstrando que a capacidade de degradar fosfolipídios da membrana bacteriana comprova a atividade bactericida dessa enzima (KODURI, 2002).

Os venenos de cobra e escorpião também possuem a fosfolipase A2 como um de seus componentes, assim como o veneno da abelha Apis foram descritos como eficazes no rompimento da membrana bacteriana de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* e *Enterobacter aerogenes*, mostrando-se eficiente frente bactérias de gram-positivo e negativo (PERUMAL SAMY, 2007).

A atividade antibacteriana também é descrita para outro produto proveniente das abelhas, a própolis. O extrato alcoólico da própolis marrom foi eficaz tanto frente a bactérias gram-positivas como frente a bactérias gram-negativas, porém com diferentes Concentração Inibitória Mínima (CIM) a depender da cepa isolada (GOMES, 2016).

### 3.3. DESENVOLVIMENTO E ESTABILIDADE DE COSMÉTICOS NATURAIS

Os cosméticos são produtos constituídos de uma formulação composta por uma ampla variedade de matérias primas, tanto sintéticas, como naturais, geralmente, são direcionados aos cuidados com a pele, cabelo, unhas, para uso terapêutico e outras diversas finalidades (CORNÉLIO e ALMEIDA, 2020).

Antes de serem lançados no mercado para os consumidores, as formulações cosméticas passam por ensaios de controle de qualidade, que visam avaliar as características físicas, químicas e microbiológicas das matérias primas, embalagens, produtos em processo e acabados. Todas as diretrizes para ensaios organolépticos, físico-químicos e químicos, além da orientação a realizar ensaios qualiquantitativos, nas diferentes formas cosméticas são veiculadas e publicadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) por meio do Guia de Controle de Qualidade de Produtos Cosméticos (2008) e do Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos (2004), tais quais ensaios organolépticos para avaliação das características detectáveis pelos órgãos de sentido, ensaios físico-químicos, sendo os mais usuais: determinação do pH, viscosidade, densidade, materiais voláteis e resíduo seco, teor de água e umidade, granulometria e centrifugação, além dos ensaios químicos para análise qualitativa e quantitativa (ANVISA, 2008).

A inovação e criação de novos produtos ou serviços se torna uma vantagem competitiva perante o mercado, é um processo de geração de novas tecnologias, que deve ser acompanhada de um processo produtivo para que essa inovação seja realizada na prática e possa atingir o consumidor. E enquanto sustentabilidade, tornou-se importante o acréscimo de produtos naturais com potenciais biológicos, a fim de produzir e criar mais valor com menores impactos sociais e ambientais de forma que reduza o consumo de recursos e o impacto sobre a natureza (ZUCCO, SOUSA e ROMEIRO, 2020).

As formulações cosméticas podem sofrer variações no decorrer do tempo dependendo de seu armazenamento ou condições externas, fazendo com que sua eficácia e segurança sejam reduzidas, justificando assim, a importância dos testes de estabilidades aplicados em sua etapa de desenvolvimento. Para além do controle de qualidade do produto, os testes de estabilidade também visam manter-se de agrado ao consumidor, também garantindo sua segurança (LADEIRA *et al.*, 2021).

### **3.4 COSMÉTICOS COM APITOXINA E POSSÍVEIS EFEITOS ADVERSOS**

A forma terapêutica mais utilizada da apitoxina é certamente na apiterapia, que consiste na aplicação do próprio ferrão das abelhas em determinados pontos do corpo humano e a apitoxina extraída aplicada por injeção intradermal, procedimento este que só pode ser realizado por médicos e o paciente deve ser monitorado caso haja algum efeito adverso. A aplicação tópica com gel foi testada por Tabtila (2019) para tratamento de uma doença gengival bastante comum na Indonésia, o gel com apitoxina foi aplicado em ratos Wistars para avaliar a eficácia da formulação no tratamento da doença gengival, o estudo demonstrou que o gel com apitoxina pode ser aplicado para acelerar o processo de cura, aumentando o número de vasos sanguíneos na angiogênese da fase proliferativa do processo de cicatrização de feridas gengivais em ratos.

Devido ao reconhecimento de suas propriedades terapêuticas no meio científico, a apitoxina configura-se como um recurso altamente relevante a ser continuamente explorado, onde apesar de resultados científicos serem encorajadores, mais pesquisa são necessárias, especialmente com modelos humano (RATCLIFFE *et al.*, 2011).

No entanto, é importante destacar que substâncias tóxicas como a apitoxina podem causar alergias e reações adversas, sendo os insetos pertencentes à ordem *Hymenoptera* (abelhas, vespas e maribondos) os responsáveis pelo maior número de mortes em humanos, comparado a outros animais venenosos, devido a graves reações alérgicas ou tóxicas, pela maior facilidade em acidentes com picadas desses insetos (SÁ e SOUSA, 2019).

O ferrão se localiza na extremidade posterior do abdômen da abelha fêmea, compreendendo uma parte glandular onde se produz o veneno, e uma estrutura quitinosa e muscular que faz a ejeção do veneno e introdução do ferrão (SÁ e SOUSA, 2019).

Normalmente, os sinais clínicos são dor leve ou intensa, calor e inchaço ao redor das ferroadas, angioedema na face, placas urticariformes pelo corpo, náuseas, vômito, dispnéia, inquietação, fraqueza generalizada, perda da consciência, edema de glote com óbito por asfixia. O estado clínico manifestado por ataques de abelhas pode resultar tanto da reação de hipersensibilidade local por uma picada (reação alérgica), quanto do envenenamento por poucas (reação tóxica local) ou múltiplas ferroadas (reação tóxica sistêmica) (FIGHERA *et al.*, 2007).

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. OBJETIVO GERAL**

Desenvolver, verificar atividades biológicas e a estabilidade preliminar e acelerada de formulações de creme cosmético com acréscimo de apitoxina.

### **4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Desenvolver três formulações cosméticas, incorporando apitoxina nas concentrações de 0,5%, 0,75% e 1,0% em base creme Polawax®;
- Testar as formulações quanto ao seu potencial de atividade antimicrobiana, fotoprotetora e antioxidante.
- Avaliar a estabilidade preliminar e acelerada das formulações (fatores físicoquímicos, organolépticos e microbiológicos) conforme prevê o Guia de estabilidade de cosméticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

## **5. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **5.1 OBTENÇÃO DE APITOXINA**

A apitoxina foi adquirida por meio de parceria com um agricultor estabelecido no município de Cascavel no ano de 2023, na propriedade denominada Rancho Bonato (BR 277 – Presidente, Cascavel - PR, 85818-560, localizada nas coordenadas -24.96962295184842, -53.3927552577887). Essa propriedade se dedica à produção

de mel e seus derivados, contando com 94 colmeias da espécie de abelhas *Apis mellifera*. O processo de obtenção da apitoxina foi automatizado pelo produtor, utilizando um propulsor de impulsos elétricos. As abelhas aplicaram o veneno por meio de seus ferrões em placas coletoras, e este veneno permaneceu em seu estado natural até a secagem. Posteriormente, foi possível extrair o veneno por raspagem das placas, fornecendo-o para o estudo na forma de pó.

Figura 1 Extração da apitoxina pelo estímulo elétrico.



Fonte: Arquivo pessoal

A apitoxina foi armazenada em frascos herméticos e congelada em um freezer convencional da Electrolux em  $-18^{\circ}\text{C}$  com variação de  $\pm 2^{\circ}\text{C}$  até desenvolvimento das formulações.

Foram obtidas duas amostras para a realização desta pesquisa, uma em agosto/2023 e outra em setembro/2023, totalizando a quantidade de 2,2g de apitoxina.

## 5.2 DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES

O creme base Polawax<sup>®</sup> Purifarma é uma cera emulsificante não-iônica de alta densidade amplamente utilizada na formulação de bases farmacológicas na forma de emulsão óleo em água (O/E) composta por Cetiol V, Nipagin, Álcool Cetoesterilico Etoxilado, Propilenoglicol e água, fora obtido na quantidade de 300g, comercialmente em uma farmácia de manipulação em Cascavel, no Paraná.

A base foi dividida em quatro frações iguais de 75g cada, para desenvolvimento de formulações nas concentrações de 0,5%; 0,75% e 1% de apitoxina e uma amostra controle sem apitoxina para ser utilizada como padrão.

Tabela 1 Formulações teste de creme cosmético com acréscimo de apitoxina.

CREME	CONCENTRAÇÃO (%)	APITOXINA
FC	0,00	0,00
F1	0,50	0,37
F2	0,75	0,56
F3	1,00	0,75

Fonte: Autora (2024)

Legenda: Formulação controle (FC); Formulação 0,50% (F1); Formulação 0,75% (F2); Formulação 1,00% (F3)

Após a pesagem do creme e da apitoxina, as formulações foram misturadas manualmente com bastão de vidro até que se obtivesse uma mistura homogênea, em seguida, armazenadas na geladeira Eletrolux a  $\pm 5^{\circ}\text{C}$  em potes de tampa rosca esterilizados, protegidas da luz até utilização em testes.

### 5.2.1. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE PRELIMINAR

Os testes de estabilidade preliminar têm como objetivo avaliar a formulação em etapas de forma que se obtenha conclusões acerca de sua estabilidade (ANVISA, 2004).

#### 5.2.1.1 TESTE DE CENTRIFUGAÇÃO

O teste de centrifugação é uma etapa introdutória aos testes de avaliação da estabilidade preliminar, caso a amostra apresente qualquer sinal de instabilidade (separação de fases, mudança de cor, mudança na textura ou viscosidade) indica-se a necessidade da reformulação. Para realização do teste de centrifugação, as três formulações e amostra controle em triplicata foram submetidas à centrifugação a 3.000 rpm durante 30 minutos repetindo o ensaio três vezes (ANVISA, 2004).

Primeiramente, 3g de cada formulação e a base creme como amostra controle foram submetidas, em triplicata, aos testes de centrifugação em Centrífuga Inox ITR Simplex II 220V, sendo centrifugadas 3 vezes por 30 minutos a 3.000 rpm.

#### 5.2.1.2 ESTRESSE TÉRMICO

Para a realização do teste de estresse térmico emprega-se condições de temperaturas extremas cujo objetivo é catalisar possíveis reações entre os componentes da formulação e indicativos que devem ser analisados de acordo com características específicas do produto em desenvolvimento. Sob as condições a seguir, esse teste não possui a finalidade de estimar a vida útil do produto, somente contribui nos testes de avaliações de triagem (ANVISA, 2008).

As amostras foram armazenadas em frasco neutro transparente estéril com tampa para garantir boa vedação, de forma que o produto não sofresse perda de gases ou vapor para o meio. Cada frasco foi preenchido até atingir 2/3 da sua capacidade

para possível troca de gases e garantir conservação das formulações teste até encerrar os testes.

Figura 2 Formulações envasadas em potes vedados.



Arquivo pessoal.

Então, as amostras foram submetidas a temperaturas extremas de aquecimento e resfriamento periodicamente, sendo avaliadas no tempo zero (início do teste) e durante 60 dias consecutivos. O ciclo adotado para o teste de estresse térmico foi empregar a temperatura de  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  em estufa por 24 horas e  $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  em refrigerador por 24 horas (ANVISA, 2004).

Para os testes de estresse térmico, foi utilizado 60g de cada formulação que foram armazenadas em frascos estéreis com tampa rosca.

Os testes foram realizados durante 60 dias, as amostras foram acondicionadas em estufa Lucadema a  $40^{\circ}\text{C} (\pm 2^{\circ}\text{C})$  e refrigerador Eletrolux a  $5^{\circ}\text{C} (\pm 2^{\circ}\text{C})$ . Durante o experimento, as análises foram realizadas no tempo 1 de 24hrs em cada temperatura, onde foram avaliados os aspectos organolépticos, cor, odor e viscosidade.

### 5.2.1.3. AVALIAÇÃO ORGANOLÉPTICA

A avaliação organoléptica refere-se aos parâmetros de aceitação do produto, avalia-se odor, aspecto, cor e sensação ao tato realizando a comparação da amostra antes de ser submetidas aos testes, durante a realização dos testes e após finalização dos testes (ANVISA, 2004).

Após a realização dos ensaios, todas as formulações foram avaliadas e comparadas com a amostra controle a fim de observar qualquer instabilidade como alteração de cor, separação de fases, alteração no odor, na textura e viscosidade.

### 5.2.1.4. AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

A avaliação físico-química de um produto em desenvolvimento é imprescindível para observar possíveis mudanças na formulação, que geralmente não são perceptíveis a olho nu, podendo significar problemas na estabilidade da

formulação ou erros no processo de formulação (ANVISA, 2004). Para essa avaliação são realizados testes de pH, o qual representa convencionalmente a acidez ou alcalinidade de uma solução, sendo sua escala de 1 (ácido), 7 (neutro) a 14 (básico) (ANVISA, 2008).

Para os testes de pH em triplicata foi utilizado o phmetro de bancada da marca Phitek modelo phs-3e manual. Foram pesados 3g de cada formulação e da amostra controle, em seguida foram diluídas em 10ml de água destilada para leitura direta no pHmetro de forma que não prejudicasse o eletrodo (Adaptado de ABRANTES, 2015)

### 5.3 AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES TERAPÊUTICAS

#### 5.3.1 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA POR DISCO-DIFUSÃO

O teste de avaliação microbiológica tem como objetivo verificar a eficácia do sistema conservante escolhido por meio dos testes de eficácia antimicrobiana e contagem microbiana (ANVISA, 2004).

Para avaliação da atividade antimicrobiana da amostra de apitoxina foi utilizado o método de disco-difusão em ágar Mueller-Hinton (AMH), adaptado do documento do Teste sensibilidade aos antimicrobianos Método de disco-difusão pelo Brazilian Committee on Antimicrobial Susceibility Testing (BRCAST, 2017).

Os inóculos foram preparados utilizando cepas *American Type Culture Collection* (ATCC) de *Staphylococcus aureus* (ATCC 23235), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Escherichia coli* (ATCC 25922) um dia antes da realização dos testes.

A preparação dos meios de cultura foi realizada conforme instrução do fabricante. Em um Erlenmeyer, pesou-se 14,40g do ágar Mueller-Hinton (AMH) em balança centesimal Marte ® modelo BL3200H que fora diluído em 400mL de água destilada e então aquecido até obter-se uma mistura homogênea e translúcida. O meio e as placas de petri foram autoclavados por 15 minutos em autoclave vertical CS-18 Primatec®. Após autoclavagem, as placas de petri foram transferidas para estufa para secagem e o meio foi armazenado em fluxo laminar até o preparo das placas.

Em seguida, verteu-se o meio nas placas de petri de modo que ficassem igualmente preenchidas. Foram utilizadas 9 placas para realização do teste em triplicata para cada micro-organismo.

Os discos foram preparados com papel filtro perfurados autoclavados e embebidos em cada amostra de creme diluídos na escala de 5mg/ml e apitoxina pura diluída em água destilada na escala de 5mg/ml.

A suspensão das cepas foi preparada em solução salina fisiológica (NaCl 0,85%) com turbidez ajustada com suspensão padronizada na escala 0,5 de McFarland ( $10^8$  células/mL), espalhada com swab esterilizado na superfície do ágar Mueller-Hinton em três direções para preenchimento completo da placa e incubado a 35°C em estufa.

Após a semeadura das cepas nas placas, os discos foram posicionados de forma que a formação de halos não ficasse sobrepostas. Para controle positivo, foi utilizado os antibióticos conforme Tabela 2 abaixo:

Tabela 2 Antibiótico utilizados com controle positivo para cada cepa testada.

CEPA	CONTROLE 1	CONTROLE 2
<i>S. aureus</i>	Nitrofurantoína	Ciprofloxacino
<i>P. aeruginosa</i>	Piperacilina	Cefepime
<i>E. coli</i>	Ceftazidima	Cefepime

Fonte: Autora (2024).

Legenda: Cepas bacterianas testadas e respectivos antibióticos utilizados como controle positivo.

A leitura foi realizada após 24h e cada halo foi medido com o auxílio de um paquímetro.

### 5.3.3 ATIVIDADE FOTOPROTETORA

Para o ensaio avaliando o potencial efeito fotoprotetor das formulações de creme com apitoxina foi pesado 1g em triplicata de cada amostra que foram diluídas em 10mL de álcool etílico e então foram realizadas as leituras no espectrofotômetro Bel Photonics UV – M51 LFQ 20 20 na faixa de comprimento de onda de 200nm a 400nm, criando uma curva de leitura para cálculo do Fator Protetor Solar (FPS). e os gráficos foram extraídos do sistema UV Professional 2.

Para o cálculo do FPS será aplicada a fórmula, onde serão avaliados os comprimentos de onda de 290nm a 320nm, conforme equação 1:

290

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

320

onde:

FC = Fator de correção (10);

EE ( $\lambda$ ) = efeito erimatogênico da radiação em cada comprimento de onda  $\lambda$ ; I

( $\lambda$ ) = intensidade da radiação solar em cada  $\lambda$ ; Abs = Absorbância em cada

$\lambda$ .

O cálculo foi realizado utilizando valores de efeito erimatogênico da radiação em cada comprimento de onda e intensidade da radiação em cada comprimento de onda por valores já tabelados por Sayre e colaboradores (1979), conforme tabela 3:

Tabela 3 Relação do do EE( $\lambda$ ) x I ( $\lambda$ ) para os comprimentos de onda de 290nm a 320nm.

$\lambda$ (nm)	EE( $\lambda$ ) x I ( $\lambda$ )
290	0,015
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278

310	0,1864
315	0,0839
320	0,018

---

Fonte: SAYRE *et al.*, (1979).

Legenda:  $\lambda$  lambda medida por nanômetro e efeito erimatogênico da radiação vezes intensidade

da radiação

### 5.3.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Para avaliar a potencial atividade antioxidante nas amostras de cremes com acréscimo de concentrações de apitoxina será utilizado o método fotolorimétrico do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) adaptado de Mensor *et al.* (2001).

A solução mãe do DPPH foi preparada pesando-se em balança centesimal Edutec® STR 224, 0,0035g do DPPH puro, diluído em 50mL em balão volumétrico, com concentração total de 0,07mg/mL. A solução foi então colocada em lavadora ultrassônica Sanders Medical® SoniClean 2PS em dois ciclos de 15 minutos, após completa homogeneização, foi armazenada em vidro âmbar e refrigerada até a realização dos testes.

Pesou-se 0,5g de cada concentração dos cremes os quais foram diluídas em 10mL de metanol, atingindo uma concentração de 0,05mg/mL, dessa concentração foi utilizado 1mL de cada amostra para 2mL da solução de DPPH, homogeneizado em vórtex mixer Edutec®, após completa homogeneização, as amostras foram armazenadas protegidas da luz por 30 minutos para reação. Todo o experimento foi realizado com o ambiente escuro, de forma a evitar degradação da solução de DPPH, sensível à luz.

Para amostra branco, foi pesado 1mL do creme base sem acréscimo da apitoxina diluído em concentração 0,05mg/mL feita anteriormente e 2mL de metanol. Para controle, foi utilizado a solução de DPPH.

A leitura da absorbância de todas as soluções foi realizada em espectrofotômetro Bel Photonics UV – M51 a um comprimento de onda de 517nm. Para as amostras, o espectrofotômetro fora zerado com a amostra branco e para controle, metanol. Todas as amostras, incluindo branco e controle foram realizadas em triplicata e com repetição, atingindo um n=6 para análise estatística e realização da ANNOVA.

A capacidade de inibir o radical DPPH (% de atividade antioxidante) foi calculada utilizando-se a equação 2:

$$\%AA = \left[ 1 - \left( \frac{\text{Abs amostra} - \text{Abs branco}}{\text{Abs controle}} \right) \right] \times 100$$

Os resultados foram expressos em porcentagem. A partir disso, a avaliação estatística foi descrita com a apresentação dos resultados em média e desvio padrão.

### 5.3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliação estatística das amostras foi realizado uma repetição dos testes de avaliação da atividade fotoprotetora e atividade antioxidante, com  $n=6$ , para estimar o erro experimental e avaliação mais precisa dos resultados.

Foi realizado Análise de Variância (ANOVA) para determinar se há diferenças significativas entre as variáveis de concentração (0%;0,5%;0,75%;1%) por meio do editor de planilhas Microsoft Excel® utilizando a análise de dados e fórmula ANOVA Fator único com valor de significância de 5% ( $p<0,05$ ).

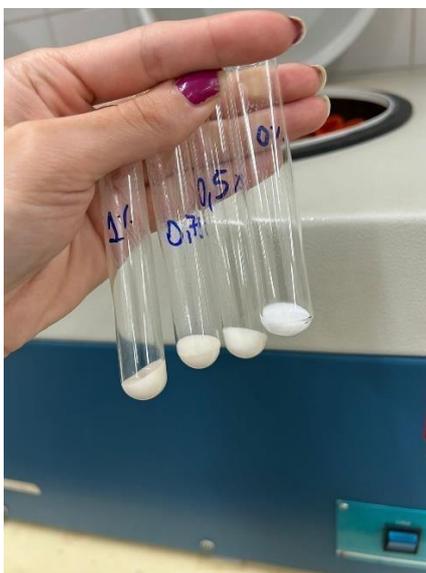
Como pós-teste foi realizado o Teste de Tukey para a comparação de médias avaliando todas as possíveis diferenças entre os pares de médias, por meio do editor de planilhas Microsoft Excel®.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE PRELIMINAR

Após a realização do teste de centrifugação, nenhuma das amostras apresentou alterações na cor, aspecto ou homogeneidade mantendo assim, a estabilidade das formulações nesta etapa introdutória das avaliações.

Figura 3 Formulações após teste de centrifugação.



Arquivo pessoal

Nos ensaios de estresse térmico não foram observadas mudanças drásticas perceptíveis visualmente nas 4 formulações. Apenas no período em que estavam sob temperatura de 40°C as formulações apresentaram formação de bolhas de ar pelo aquecimento, o que não se classifica como uma alteração expressiva nas formulações. As formulações F2 e F3 apresentavam uma coloração levemente amarronzada devido a maior concentração de apitoxina, que possui uma coloração marrom clara.

De acordo com o Guia de Estabilidade de Cosméticos (ANVISA, 2004) os resultados obtidos perante os ensaios de estabilidade preliminar se enquadram aos

parâmetros adequados de qualidade com características ideais e de uniformidade comprovada.

Os resultados satisfatórios nos testes preliminares são fundamentais porque garantem que as formulações sejam estáveis e seguras para uso. A estabilidade das emulsões é essencial para a eficácia do produto final, pois formulações instáveis podem levar a separação de fases, alteração de propriedades físico-químicas e, conseqüentemente, a perda de eficácia e segurança do produto. Além disso, resultados positivos nesta etapa indicam que a formulação está em conformidade com os padrões de qualidade exigidos, o que é essencial para a aceitação do produto no mercado. Portanto, a obtenção de resultados satisfatórios nos testes preliminares é um passo crítico para o sucesso do desenvolvimento de cosméticos, assegurando que o produto final atenda às expectativas dos consumidores e às regulamentações do setor (MANOCHIO PINTO, 2020).

Este estudo, assim como o de Abrantes (2020), demonstrou que a incorporação de apitoxina em formulações cosméticas de uso tópico resultou em produtos estáveis, sem sinais de instabilidade nos testes preliminares. Esses resultados indicam que a apitoxina foi adequadamente incorporada, sem comprometer a qualidade do produto final.

## 6.2 AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

Os resultados obtidos com a determinação de pH das formulações estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 Resultado médio e desvio padrão da análise, em triplicata, de pH de amostras de creme cosmético a base de apitoxina.

CONCENTRAÇÃO (%)	pH
FC	5.55(±2.35)
F1	4.82(±2.19)
F2	4.93(±2.22)
F3	5.30(±2.34)

Fonte: Autora (2024)

Legenda: Formulação controle (FC); Formulação 0,50% (F1); Formulação 0,75% (F2); Formulação 1,00% (F3).

Quanto à determinação de pH, os resultados médios das amostras revelaram um pH levemente ácido, ideal para aplicação na derme. O pH é um parâmetro crítico nas formulações farmacêuticas, desempenhando um papel fundamental na compatibilidade com a pele, estabilidade da formulação, eficácia do princípio ativo e avaliação da qualidade do produto. É essencial que o pH das formulações esteja próximo ao pH cutâneo, que varia entre 4,5 e 5,5, para evitar irritações e garantir a segurança do produto ao ser aplicado na pele (ABRANTES, 2015). Para cada área do corpo são indicados cosméticos distintos e específicos, considerando que cada parte corporal possui um pH diferenciado. Os cosméticos aplicados na pele não devem alterar o pH da epiderme, pois isso poderia torná-la mais suscetível à atividade de micro-organismos (ARAÚJO *et al.*, 2022).

Resultados superiores para este parâmetro foram observados por Abrantes (2015) ao investigar a estabilidade e eficácia de formulações de apitoxina a 0,1% em

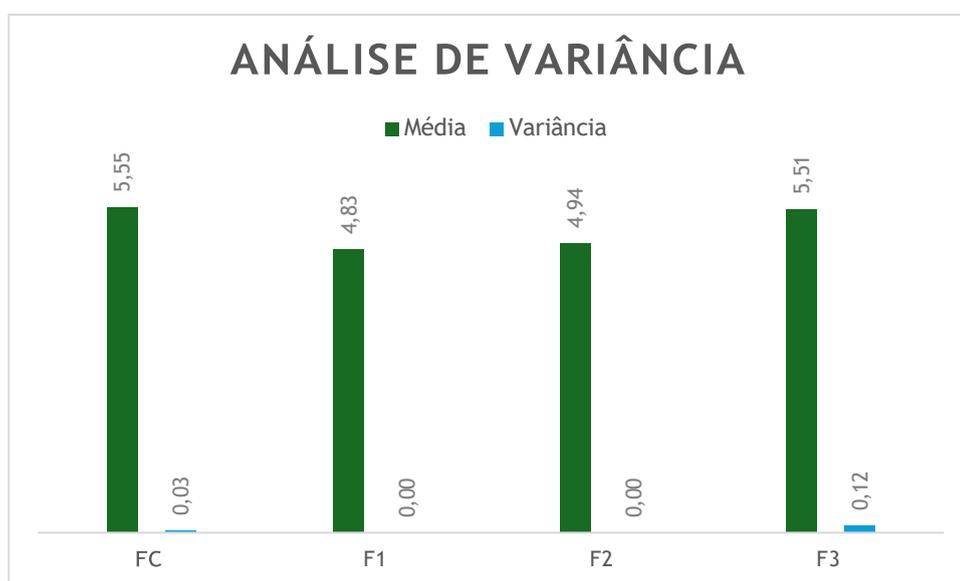
emulsão aniônica e gel Carbopol 940®, os valores de pH das formulações de apitoxina variaram entre 6,21 e 6,81, o que, embora ligeiramente acima do ideal, foi descrito no estudo como aceitável para aplicações dermatológicas. O autor explica que a base do creme, especificamente a emulsão aniônica, apresenta um pH mais alto em comparação ao ideal para a pele, que é mais ácido. Assim, os resultados mais elevados do pH foi atribuído à composição dos ingredientes utilizados na formulação, que incluem componentes que podem influenciar o pH final do produto.

Considerando que o Polawax® é uma cera emulsionante com pH relativamente neutro, quando combinado com componentes ácidos, como os presentes na apitoxina, o equilíbrio do pH da emulsão pode se deslocar para o lado ácido, o que pode justificar os resultados deste trabalho.

### 6.2.1 ANÁLISE ESTÁTISTICA

Os valores obtidos da média entre as leituras e desvio-padrão foram submetidas a análise de variância conforme demonstrado na figura 4 abaixo:

Figura 4 Gráfico de análise de variância do teste de pH comparando valores de média e variância.



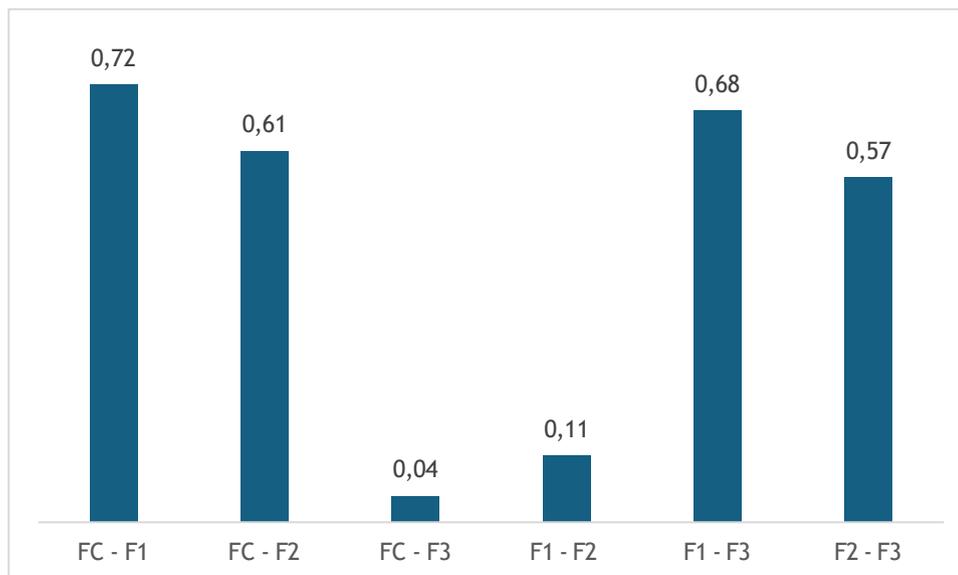
Fonte: Autora (2024).

O gráfico da figura x indica que as médias dos grupos FC e F3 apresentaram valores médios próximos de pH sendo 5,55 e 5,51 respectivamente. Os grupos F1 e F2 apresentaram valores de pH 4 sendo 4,83 e 4,94 respectivamente. Todas as amostras demonstram pH ácido em faixas próximas. A variância observada mostra que os valores obtidos estão próximos da média.

O valor-p obtido enquadra-se em um valor menor que 0,05, sendo esse o valor utilizado para a significância. Um valor-p <0,05 indica que a hipótese nula ( $H_0$ ) de que não há nenhuma diferença entre os grupos seja descartada e que a hipótese alternativa ( $H_1$ ) de que há diferença entre os grupos seja considerada.

O Teste de Tukey realizado com os resultados da ANOVA para as médias obtidas para o teste de atividade fotoprotetora indicou uma diferença mínima significativa de 0,50 entre os pares de amostras, os valores obtidos estão indicados na figura 5 abaixo:

Figura 5: Gráfico obtido pelo teste de tukey comparando valores de média entre os pares.



Fonte: Autora (2024).

Foram observadas diferenças significativas entres os pares FC-F1, FC-F2, F1-F3 e F2-F3, não possuindo diferença estatística significativa entre os pares FC-F3 e F1-F2.

O creme-base Polawax ® possui um pH registrado na ficha técnica que varia entre 5,5 e 7,0, estando próximo do pH neutro, a formulação FC, sem acréscimo de apitoxina mostrou o valor de 5,55 de pH, constatando o valor observado na ficha técnica, enquanto a amostra F3, com concentração de 1% de apitoxina, demonstrou um valor próximo ao pH do creme-base.

Esses resultados indicam que o pH observado está relacionado a concentração de apitoxina nas formulações e pode indicar uma instabilidade da substância em maiores concentrações nas formulações.

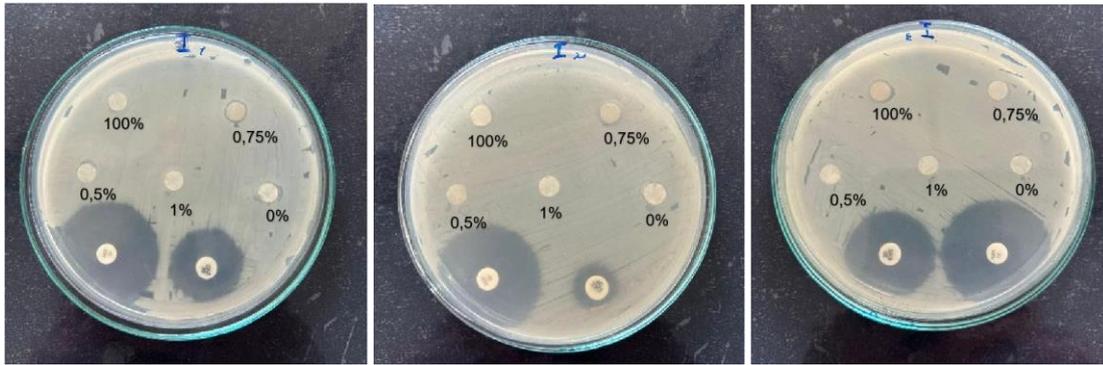
No estudo de Abrantes (2015) o autor explana que os valores de pH podem ser alterados de acordo com a composição das formulações, indicando que o creme-base utilizado pode ter influenciado o pH da apitoxina na formulação F3.

## 6.3 AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADE TERAPÊUTICAS

### 6.3.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA POR DISCO-DIFUSÃO

A atividade antibacteriana das amostras de creme com diferentes concentrações de apitoxina foi avaliada frente às cepas bacterianas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, e *Pseudomonas aeruginosa*. A leitura das placas foi realizada após 24 horas de incubação a 35°C. Os resultados são apresentados abaixo. As amostras de creme, bem como, a apitoxina pura, não demonstraram atividade antibacteriana contra *E. coli*. Em contraste, os antibióticos utilizados como controle positivo, Ceftazidima e Cefepime, apresentaram halos de inibição conforme apresentado na figura 6 e tabela 5.

Figura 6 Placas de disco-difusão semeadas com *E. coli*.



Arquivo pessoal.

Legenda: Apitoxina pura diluída (100%); Formulação 0,50% (0,5%); Formulação 0,75% (0,75%); Formulação 1,00% (1%), Creme base diluído (0%).

Tabela 5 Medidas do diâmetro dos halos formados nas placas semeadas com *E. coli*.

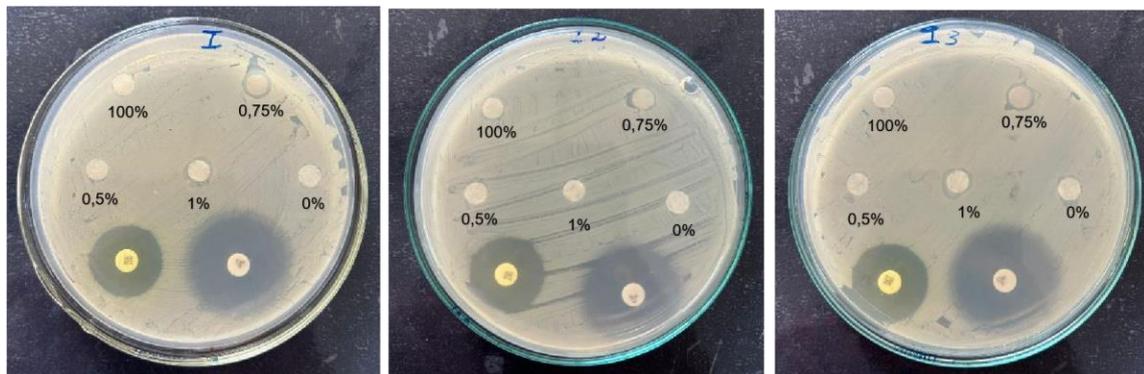
ANTIBIÓTICO	CEFTAZIDIMA	CEFEPIME
PLACA 1	23mm	33mm
PLACA 2	13mm	30mm
PLACA 3	26mm	33mm

Fonte: Autora (2024).

A sensibilidade dos antibióticos foi conforme esperado: Cefotaxima (23mm – 29mm) e Cefepime (31mm - 37mm).

Para as amostras testadas frente a *S. aureus*, as diluições dos cremes e a apitoxina pura, também não apresentaram atividade antibacteriana. Os controles positivos com discos de Nitrofurantoína e Ciprofloxacina formaram halos conforme apresentado na Figura 7 e detalhado na Tabela 6.

Figura 7 Placas de disco-difusão semeadas com *S. aureus*.



Arquivo pessoal.

Legenda: Apitoxina pura diluída (100%); Formulação 0,50% (0,5%); Formulação 0,75% (0,75%); Formulação 1,00% (1%), Creme base diluído (0%).

Tabela 6 : Medidas do diâmetro dos halos formados nas placas semeadas com *S. aureus*.

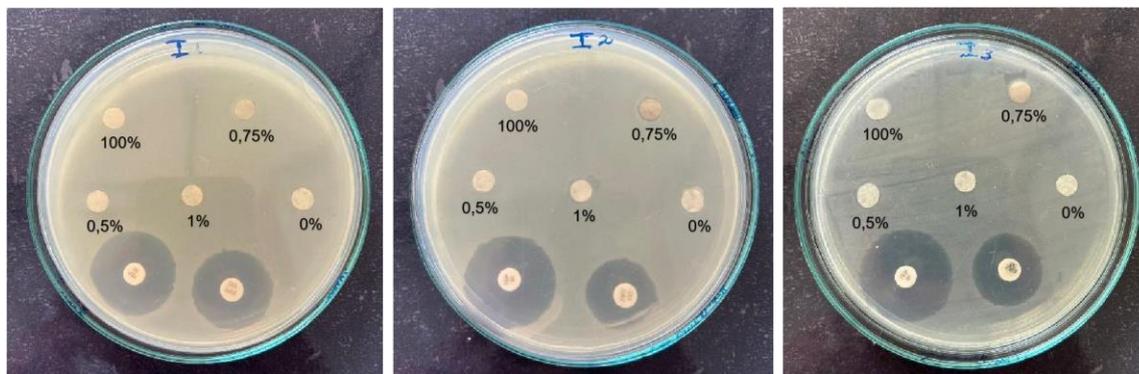
ANTIBIÓTICO	NITROFURANTOÍNA	CIPROFLOXACINA
PLACA 1	27mm	19mm
PLACA 2	25mm	20mm
PLACA 3	28mm	20mm

Fonte: Autora (2024).

A sensibilidade padrão dos antibióticos observada foi: Nitrofurantoína (17mm – 23mm) e Ciprofloxacina (21mm – 27mm).

As amostras de creme com diferentes concentrações de apitoxina e apitoxina pura não apresentaram atividade antibacteriana contra *P. aeruginosa*. Os antibióticos Piperacilina e Cefepime foram usados como controles positivos, com halos conforme mostrado na Figura 8 e Tabela 7.

Figura 8 Placas de disco-difusão semeadas com *P. aeruginosa*.



Arquivo pessoal.

Legenda: Apitoxina pura diluída (100%); Formulação 0,50% (0,5%); Formulação 0,75% (0,75%); Formulação 1,00% (1%), Creme base diluído (0%).

Tabela 7 Medidas do diâmetro dos halos formados nas placas semeadas com *P. aeruginosa*.

ANTIBIÓTICO	PIPERACILINA	CEFEPIME
PLACA 1	22mm	23mm
PLACA 2	19mm	25mm
PLACA 3	20mm	26mm

Fonte: Autora (2024).

A sensibilidade padrão observada foi: Piperacilina (23mm – 29mm) e Cefepime (25mm – 31mm).

Os resultados indicam que as amostras de creme contendo apitoxina, em diferentes concentrações, não demonstraram atividade antibacteriana contra as cepas testadas de *E. coli*, *S. aureus*, e *P. aeruginosa*. Este achado sugere que, nas condições experimentais avaliadas, a apitoxina não é eficaz como agente antibacteriano.

Os halos observados nos controles positivos confirmam a eficácia dos antibióticos tradicionais (Ceftazidima, Cefepime, Nitrofurantoína e Ciprofloxacina) contra as respectivas cepas bacterianas, validando o protocolo experimental utilizado. No entanto, a ausência de atividade antibacteriana da apitoxina pode ser atribuída a vários fatores, incluindo sua concentração inadequada, o método de aplicação, ou possíveis interações com os componentes do creme (VIANA, 2015).

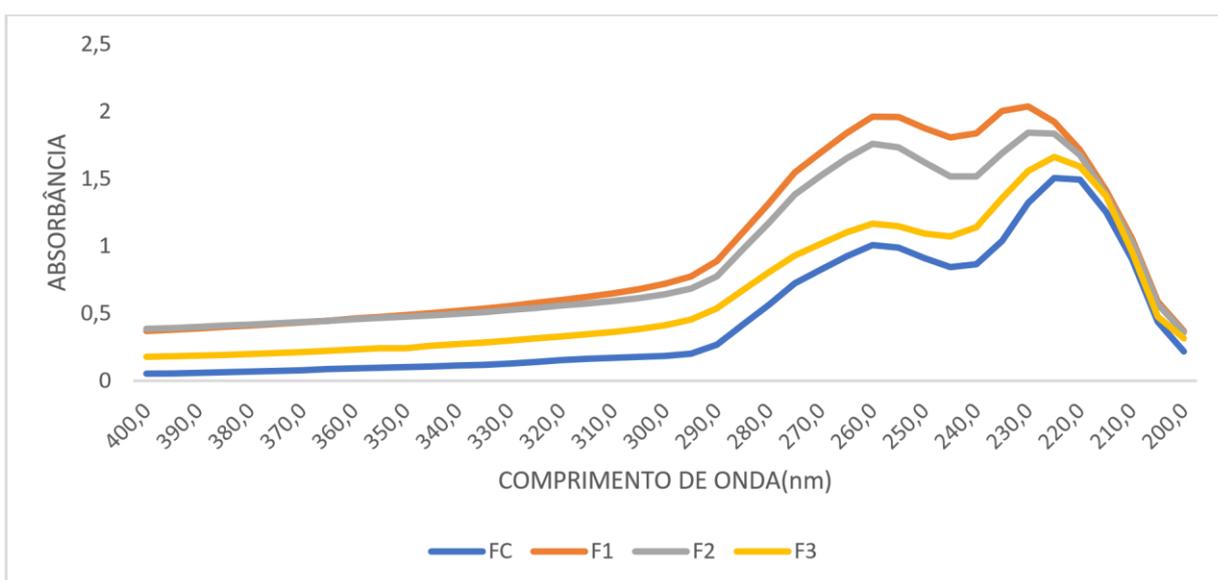
Em contraste com os resultados deste trabalho, que não demonstraram atividade antimicrobiana, o estudo de Viana (2015), utilizando o método de difusão em ágar Mueller Hinton (AMH), pela técnica de perfuração de poços, revelou eficácia da apitoxina contra várias cepas bacterianas, incluindo *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*. No entanto, *S. aureus* se mostrou a mais resistente, embora ainda respondesse à apitoxina. Esses achados sugerem que a apitoxina possui potencial antimicrobiano, mas sua eficácia pode ser influenciada por variações nas condições experimentais, na composição da amostra ou na metodologia empregada.

Essa discrepância destaca a importância de investigar mais profundamente os fatores que podem afetar a atividade antimicrobiana de substâncias naturais, como a apitoxina e sua composição, bem como a necessidade de estudos adicionais para esclarecer os mecanismos de ação e identificar os compostos bioativos responsáveis por essa atividade.

#### 6.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FOTOPROTETORA

Os resultados obtidos a partir do ensaio do efeito fotoprotetor por meio da leitura das amostras em espectrofotômetro estão representadas no gráfico abaixo:

Figura 9 Gráfico de leitura das amostras FC, F1, F2 e F3.



Fonte: Autora (2024).

O gráfico da figura 9 indica os resultados obtidos da leitura da absorbância entre as quatro formulações avaliadas. Na leitura espectrofotométrica, foi possível observar maiores absorbâncias na formulação F1 que continha 0,5% de apitoxina, com picos de absorção na faixa de 230nm a 260nm. Porém nenhuma das formulações demonstrou um potencial de proteção frente a radiação UVB (280-320) e UVA (320 a 400 nm).

Esses resultados podem ser reflexo de reações químicas indesejadas entre os componentes da formulação ou instabilidade dos ingredientes ativos. A apitoxina é constituída por diversos compostos voláteis que podem se perder durante a coleta, bem como, apresenta-se solúvel em água e insolúvel em álcool. Além disso por ser uma substância bastante complexa, constituída por diversos componentes, desconhece-se até então todas as interações realizadas pelas substâncias componentes (SANTOS e MIKITO, 2023). Sugerindo uma possível instabilidade da apitoxina ou de um dos seus componentes.

A eficácia dos protetores solares é dependente da sua capacidade de absorver, refletir e/ou dispersar a radiação ultravioleta evitando seus danos, sendo

capaz de proteger a pele de eritemas e edemas, reduzindo o risco de queimaduras, de carcinoma de células da camada basal e espinhosa (TOYOSHIMA *et al.*, 2004).

Viana (2019) realizou ensaios de atividade fotoprotetora da apitoxina *in vivo* com aplicação tópica de gel com incorporação de apitoxina de 5.0% e 2.5% a cada 10g de gel, assim, após leitura espectrofotométrica do FPS, o gel foi aplicado na pele de ratos Wistar e submetidos a irradiação UVB. Os grupos de ratos que tiveram aplicação tópica do gel com incorporação da apitoxina e o grupo de controle negativo apresentaram aspectos morfológicos dentro da normalidade, sem alterações, sugerindo uma potencial atividade fotoprotetora UVB da apitoxina, no entanto, a autora traz que a fotoproteção pode estar associada à atividade antioxidante da apitoxina, que combinadas, podem potencialmente gerar um efeito de fotoproteção.

De acordo com Pinho e colaboradores (2014) o Fator de Proteção Solar é o principal dado para quantificação da eficácia fotoprotetora de uma substância cosmética ou filtro solar, sendo universalmente aceito.

#### 6.4.1 CÁLCULO DO FATOR DE PROTEÇÃO SOLAR

Os cálculos foram realizados com base em resultado prévio da leitura das amostras nos comprimentos de onda de 320nm a 290nm e dispostos conforme segue:

Tabela 8 Cálculo de FPS da amostra FC.

$\lambda$ (nm)	Abs(nm)	EE x I	<u>Abs x(EE x I)</u>
320	0,1543	0,018	0,0027774
315	0,1633	0,0839	0,0137009
310	0,1706	0,1864	0,0317998
305	0,1779	0,3278	0,0583156
300	0,1851	0,2874	0,0531977
295	0,2023	0,0817	0,0165279
290	0,2693	0,015	0,0040395
<b>Soma de Abs x EE x I = 0,180359</b>			
<b>0,180359 x10 = 1,80 FPS</b>			

Fonte: Autora (2024).

Tabela 9 Cálculo de FPS da amostra F1.

$\lambda$ (nm)	Abs(nm)	EE x I	<u>Abs x(EE x I)</u>
320	0,6016	0,018	0,0108288
315	0,6243	0,0839	0,0523788
310	0,6494	0,1864	0,1210482
305	0,6806	0,3278	0,2231007
300	0,7221	0,2874	0,2075315
295	0,777	0,0817	0,0634809
290	0,8895	0,015	0,0133425

**Soma de Abs x EE x I = 0,691711**  
**0,691711 x10 = 6,91 FPS**

Fonte: Autora (2024).

Tabela 10 Cálculo de FPS da amostra F2.

$\lambda$ (nm)	Abs(nm)	EE x I	Abs x(EEI)
320	0,5599	0,018	0,0100782
315	0,5757	0,0839	0,0483012
310	0,5934	0,1864	0,1106098
305	0,6145	0,3278	0,2014331
300	0,6442	0,2874	0,1851431
295	0,6860	0,0817	0,0560462
290	0,7758	0,015	0,011637

**Soma de Abs x EE x I = 0,623249**  
**0,623249 x10 = 6,23 FPS**

Fonte: Autora (2024).

Tabela 11 Cálculo de FPS da amostra F3.

$\lambda$ (nm)	Abs(nm)	EE x I	Abs x(EEI)
320	0,3312	0,018	0,0059616
315	0,3462	0,0839	0,0290462
310	0,3630	0,1864	0,0676632
305	0,3839	0,3278	0,1258424
300	0,4128	0,2874	0,1186387
295	0,4548	0,0817	0,0371572
290	0,5380	0,015	0,00807

**Soma de Abs x EE x I = 0,392379**  
**0,392379 x10 = 3,92 FPS**

Fonte: Autora (2024).

Analisando os valores de FPS obtidos, observa-se que a apitoxina nas concentrações das amostras F1 e F2 demonstram uma atividade fotoprotetora pois apresentaram valores de FPS adequado (FPS > 6), já as amostras FC e F3 demonstraram resultados que não há atividade fotoprotetora nessas formulações, apresentando valores de FPS inadequados (FPS < 6).

De acordo com a Resolução - RDC nº 30, de 1º de junho de 2012 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2012), a qual estabelece critérios para classificação do grau de proteção solar, o Fator de Proteção Solar (FPS) adequado para produtos cosméticos

com atividade fotoprotetora devem apresentar valores iguais ou superiores a 6. Embora as amostras apresentem tais valores de FPS, as formulações não podem ser consideradas adequadas como filtro solar. Para avaliar uma substância natural como apta a ser considerada filtro solar, deve ser considerado se há proteção UVA e UVB, no cálculo acima somente é levado em consideração os comprimentos de onda referentes as regiões de UV, que representam UVB.

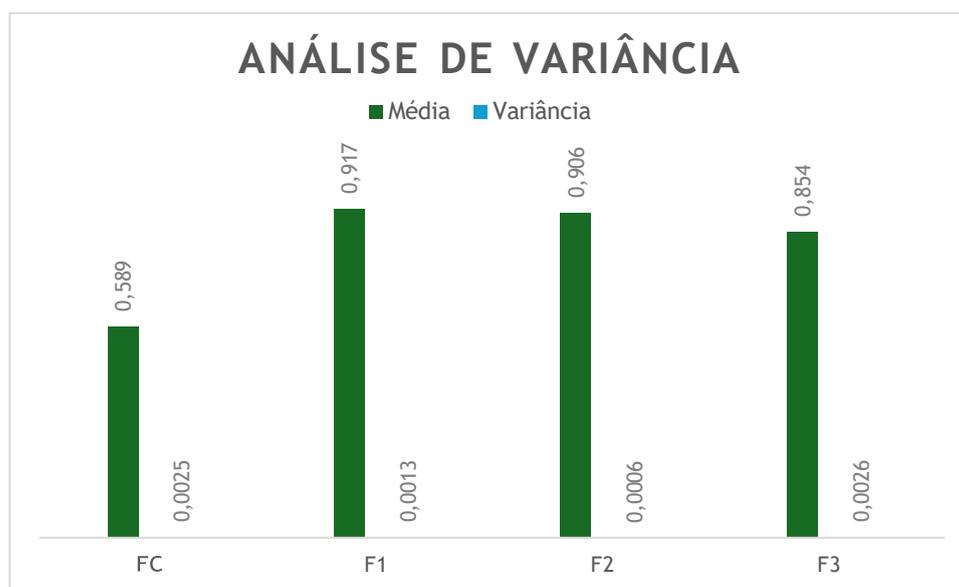
#### 6.4.2 ANÁLISE ESTÁTISTICA

Para as amostras lidas no intervalo de 290nm a 400nm, a análise de variância foi realizada com base na soma, média e variância da leitura em triplicata considerando  $n=3$ .

A significância estudada foi de 95%, o valor de F resultante de 73,03 indica há grande variabilidade entre os grupos estudados, sendo esses, separados dentre as 4 formulações (FC, F1, F2 e F3) com a contagem dos 23 comprimentos de onda lidos em triplicata.

A figura 10 abaixo expõe a análise de variância entre a média das amostras estudadas:

Figura 10 Análise de variância obtida pela média da leitura da atividade fotoprotetora.



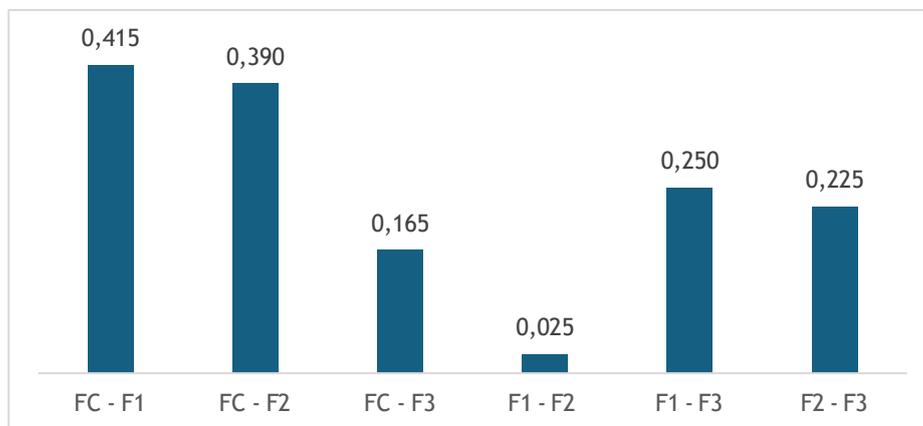
Fonte: Autora (2024).

O gráfico da figura x indica que as médias dos grupos F1 e F2 apresentaram valores superiores que os grupos FC e F3, bem como, a variância observada mostra que os valores obtidos estão próximos da média.

O valor-p obtido enquadra-se em um valor menor que 0,05, sendo esse o valor utilizado para a significância. Um valor-p  $<0,05$  indica que a hipótese nula ( $H_0$ ) de que não há nenhuma diferença entre os grupos seja descartada e que a hipótese alternativa ( $H_1$ ) de que há diferença entre os grupos seja considerada.

O Teste de Tukey realizado com os resultados da ANOVA para as médias obtidas para o teste de atividade fotoprotetora indicou uma diferença mínima significativa de 0,215 entre os pares de amostras, os valores obtidos estão indicados na figura 11 abaixo:

Figura 11 Resultados obtidos pelo teste de tukey comparando a média entre os pares.



Fonte: Autora (2024).

Foram observadas diferenças significativas entre os pares FC-F1, FC-F2, F1-F3 e F2-F3, não possuindo diferença estatística significativa entre os pares FC-F3 e F1-F2.

Esses resultados indicam que a potencial atividade fotoprotetora da apitoxina pode ser relacionada com a estabilidade da substância e as interações entre seus componentes (MOURELLE, 2011), e apresentando-se em maior concentração na formulação pode não promover a atividade terapêutica desejada.

Já as amostras com 0,5% e 0,75% de concentração de apitoxina mostraram resultados bem próximos e maior potencial de atividade fotoprotetora.

## 6.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

As amostras das formulações F1, F2, F3, controle e branco foram lidas em triplicata e os resultados obtidos encontram-se na tabela, sendo a média e desvio-padrão:

Tabela 12 Resultado médio e desvio padrão da absorvância encontrada das leituras realizadas em triplicata.

<b>FC</b>	0,589 ( $\pm 0,050$ )
<b>F1</b>	0,917 ( $\pm 0,036$ )
<b>F2</b>	0,906 ( $\pm 0,024$ )
<b>F3</b>	0,854 ( $\pm 0,051$ )
<b>Branco</b>	0,065 ( $\pm 0,011$ )
<b>Controle</b>	1,921 ( $\pm 0,026$ )

Fonte: Autora (2024).

A atividade antioxidante das amostras foi calculada com base na equação 2 e os resultados estão dispostos em porcentagem conforme Tabela 13 abaixo:

Tabela 13 : Resultados em porcentagem do valor obtido para atividade antioxidante por meio do cálculo da equação

2

### ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (%)

<b>FC</b>	72,72%
<b>F1</b>	55,64%
<b>F2</b>	56,27%
<b>F3</b>	58,92%

---

Fonte: Autora (2024).

O método DPPH é utilizado para avaliar a capacidade de sequestro dos radicais livres e a capacidade de uma substância ser agente antioxidante, sendo baseado na medição da atenuação da absorbância do radical DPPH após o início da reação. É considerado simples, exato e acessível (OLIVEIRA, 2015). A interação entre uma substância potencialmente antioxidante com o DPPH depende de sua fórmula estrutural e o número de moléculas reduzidas de DPPH pode estar correlacionado com o número de grupos hidroxilo presentes (VIANA *et al.*, 2015).

A avaliação da atividade antioxidante da apitoxina ainda é pouco difundida na literatura, porém estudos com outros produtos apícolas como mel e própolis trazem resultados satisfatórios. O trabalho de Oliveira *et al.* (2012) trouxe resultados que demonstram maior atividade antioxidante em méis produzidos pelas abelhas africanizadas (*Apis mellifera*), tendo maior inibição do do radical DPPH e ilustrando uma capacidade antioxidante significativa em relação às outras espécies de abelha analisadas.

Nascimento (2016) avaliou méis produzidos por *A. mellifera* em diferentes regiões de cultivo plantar, observando que a atividade antioxidante foi significativa em méis de áreas com plantação de eucalipto e aroeira, além de observar a forte correlação dos compostos fenólicos com a atividade antioxidante do mel.

De-Melo *et al.* (2014) avaliaram a capacidade antioxidante da própolis produzida pela abelha africanizada em 4 diferentes regiões do Brasil e constatou-se que somente duas das amostras apresentaram capacidade antioxidante abaixo de 60%, concluindo que a própolis é uma potente substância antioxidante e que a variação de sua composição de região para região, ainda mantém sua capacidade de sequestro de radicais livres.

O estudo promovido por Sobral *et al.* (2015) abordou especificamente a atividade antioxidante na apitoxina em solução aquosa, todas as amostras avaliadas por meio do ensaio de DPPH demonstraram capacidade antioxidante obtendo um IC50 = 0,225mg/mL, os resultados são descritos indicando que há concentrações específicas de apitoxina em que os compostos se mostram mais ativos, evidenciando uma capacidade anti-inflamatória e antioxidante, porém não há correlação da atividade antioxidante com os componentes isolados do veneno.

Viana *et al.* (2021) avaliaram a atividade antioxidante da apitoxina pelo ensaio DPPH e observou-se que em maiores concentrações, maiores eram o consumo do DPPH, demonstrando menores valores na absorbância visualizada, a maior concentração utilizada foi de 1mg/mL e apresentou uma porcentagem de 74,92% de capacidade antioxidante, os resultados descritos trazem um IC50 de 0.648mg/mL para a capacidade de inibição do radical DPPH pela solução metanólica de apitoxina.

A atividade antioxidante expressa em porcentagem de redução do DPPH indica que quanto maior a porcentagem obtida, maior foi o sequestro de radicais livres pela substância. Os resultados obtidos nesse presente trabalho indicam que as formulações F1, F2 E F3 possuem atividade antioxidante superior a 50%, sendo 55,64%; 56,27% e 58,92% respectivamente, porém contrastam com o achado na formulação FC atingindo 72,72%.

Esta disparidade indica a necessidade de análises mais amplas sobre os fatores capazes de causarem alteração na capacidade antioxidante ou instabilidade na composição da apitoxina, bem como, estudar a solubilidade das formulações de creme com acréscimo do veneno em solução metanólica, utilizada nos experimentos. Apontando, também, uma demanda de mais estudos sobre a estabilidade da apitoxina em formulações cosméticas e identificação de parâmetros para potencializar suas atividades biológica para aplicação em saúde.

### 6.5.1 ANÁLISE ESTATÍSTICA

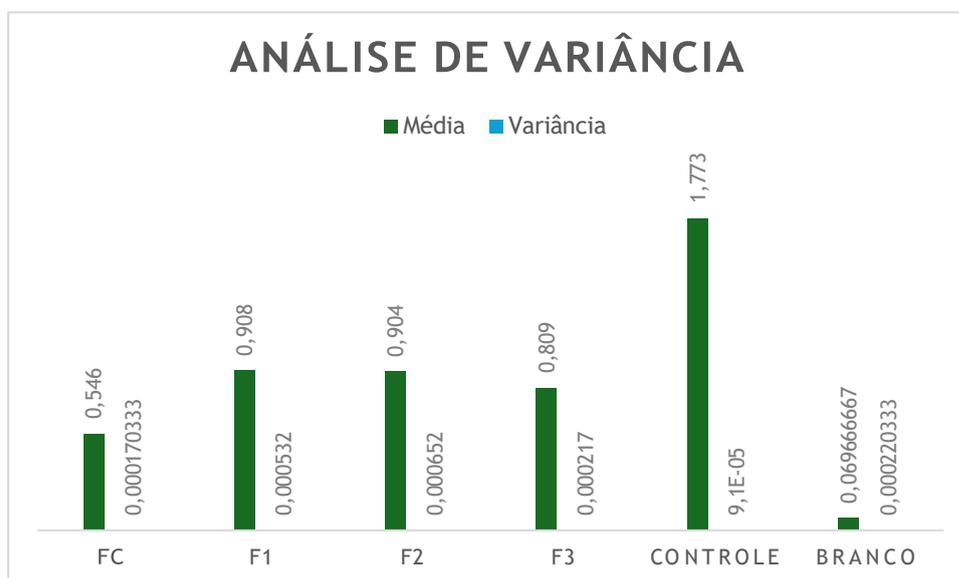
A análise de variância foi realizada conforme valores obtidos pela soma, média e variância entre cada amostra analisada, considerando  $n=6$

Considerando o nível de significância sendo de 5%, o valor-p obtido pela Anova é  $<0,05$  indicando que a hipótese nula ( $H_0$ ), de que não há diferença entre as médias, pode ser rejeitada e demonstrando que a hipótese alternativa ( $H_1$ ), de que pelo menos uma das concentrações (variáveis) é diferente, é verdadeira.

O valor de F obtido pela análise de variância é de 81,6379. Um valor alto de F indica que a variabilidade entre os grupos (concentrações) avaliados é grande, que possui um ou mais grupos que diferem entre si. Porém, a análise de variância não indica quais grupos se diferem entre si, apenas que um ou mais grupos são diferentes estatisticamente.

A figura 12 indica a comparação dos valores de média observados e sua variância:

Figura 12 Análise de variância da leitura das amostras quanto a atividade antioxidante.



Fonte: Autora (2024)

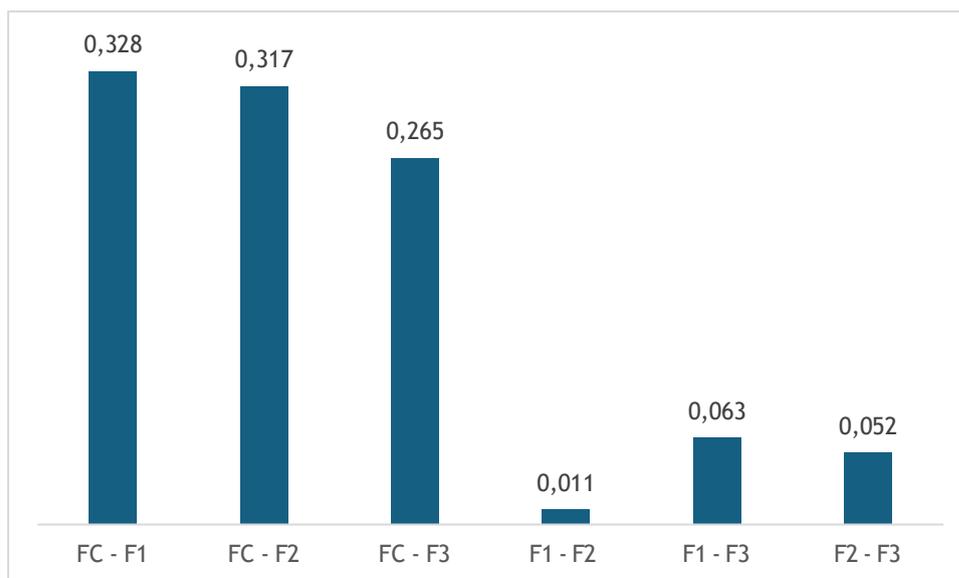
O gráfico da figura 12 indica que as médias dos grupos F1 e F2 estão em faixas próximas sendo 0,908 e 0,904 respectivamente, já a amostra F3 demonstrou um valor de 0,809. O grupo controle demonstrou um valor de média elevado em relação aos grupos restantes. Observou-se um valor menor para a amostra FC sendo de 0,546, menor valor em comparação aos outros grupos.

O valor-p obtido enquadra-se em um valor menor que 0,05, sendo esse o valor utilizado para a significância. Um valor-p  $<0,05$  indica que a hipótese nula ( $H_0$ ) de que

não há nenhuma diferença entre os grupos seja descartada e que a hipótese alternativa ( $H_1$ ) de que há diferença entre os grupos seja considerada.

O Teste de Tukey realizado com os resultados da ANOVA para as médias obtidas para o teste de atividade fotoprotetora indicou uma diferença mínima significativa de 0,068 entre os pares de amostras, os valores obtidos estão indicados na figura 13 abaixo:

Figura 13 Resultados obtidos pelo teste de tukey comparando a média entre os pares.



Fonte: Autora(2024).

Não foram observadas diferenças significativas entre os pares FC-F3 e F1-F2. Os pares FC-F1, FC-F2, F1-F3 e F2-F3 demonstraram diferenças significativas entre si.

Esses resultados indicam que o efeito antioxidante nas amostras com acréscimo de apitoxina são potenciais. Pode ser diretamente relacionado com a composição da apitoxina, que apesar de ser variável conforme a sazonalidade e bioma onde se encontra a colméia (DANTAS, 2013), mantém-se suas propriedades terapêuticas.

## 7. CONCLUSÃO

O presente estudo é uma análise inicial da utilização da apitoxina enquanto substância bioativa com potencial de aplicação em saúde. As formulações com acréscimo de apitoxina mantiveram-se estáveis até a finalização dos testes e demonstraram potencial efeito fotoprotetor e efeito antioxidante. Não foi observado atividade biológica antibacteriana frente as cepas testadas.

## 8. REFERÊNCIAS

- ABRANTES, A. F. Avaliação da qualidade da Apitoxina de *Apis mellifera* e sua estabilidade na formulação de uso tópico. **Dissertação (Mestrado Profissional)**, Universidade Federal de Campina Grande, Pombal, Paraíba (Brasil), 2015.
- ABD EL-WAHED, A. A. et al. Bee venom composition: From chemistry to biological activity. **Studies in Natural Products Chemistry**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 459–484.
- ALMEIDA, F. B. DE et al. A utilização da apitoxina na apiterapia e seus efeitos no tratamento de patologias. **ACTA Apícola Brasilica**, v. 5, n. 1, p. 16–20, 2017.
- ALVES, C. Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química nova**, v. 33, n. 10, p. 2202–2210, 2010.
- AMIN, M. A.; ABDEL-RAHEEM, I. T. Accelerated wound healing and anti-inflammatory effects of physically cross linked polyvinyl alcohol-chitosan hydrogel containing honey bee venom in diabetic rats. **Archives of pharmacal research**, v. 37, n. 8, p. 1016–1031, 2013.
- BAUER, A. W. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. **Am J clin pathol**, v. 45, p. 149-158, 1966.
- BOCHNIE, K. A.; GREGÓRIO, P. C.; MACIEL, R. A. P. Análise da viabilidade celular por mtt em células tratadas com toxinas urêmicas – revisão. **Cadernos da Escola de Saúde**, v. 1, n. 15, 14 mar. 2017.
- CLINICAL and Laboratory Standards Institute (CLSI). **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts**. 2002; M27-A2. 3rd.ed. Wayne, Pa, USA.
- COELHO, J. P. M. Identificação e quantificação de compostos fenólicos em própolis da região sul do Brasil. Avaliação da atividade antioxidante por técnicas espectroscópicas e eletroquímicas. **Dissertação (Mestrado em Farmácia e Química de Produtos Naturais)**. Instituto Politecnico de Bragança (Portugal), 2013.
- CORNÉLIO, M. L.; ALMEIDA, E. C. C. Decifrando a Composição dos Cosméticos: Riscos e Benefícios. Uma Visão do Consumidor sobre o Uso de Produtos Cosméticos. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 5, p. 30563–30575, 2020.
- DANTAS, C. G. et al. Apitoxina: coleta, composição química, propriedades biológicas e atividades terapêuticas. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v. 4, n. 2, p. 127–150, 2014.
- DE BRITO, J. C. M. Fracionamento do veneno da *Apis mellifera* utilizando membranas de ultrafiltração de celulose regenerada de 10 KDA. **Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)**. Universidade Federal de Minas Gerais (Brasil), 2015.
- DOS SANTOS, C. S.; RIBEIRO, A. S. Apicultura uma alternativa na busca do desenvolvimento sustentável. **Revista verde de agroecologia e desenvolvimento sustentável**, v. 4, n. 3, p. 1, 2009.
- FEITOSA, A. DO N. A. et al. PRODUTOS APÍCOLAS E SAÚDE HUMANA: UMA REVISÃO INTEGRATIVA: BEE PRODUCTS AND HUMAN HEALTH: AN INTEGRATIVE REVIEW. **Brazilian Journal of Production Engineering - BJPE**, p. 34–44, 2020.
- FIGHERA, R.A.; *et al.* Acidente provocado por picada de abelhas como causa de morte de cães. **Ciência Rural**, v.37, n.2, p.590-593, mar./abr., 2007 FLOR, Juliana;

- DAVOLOS, Marian Rosaly; CORREA, Marcos Antonio. Protetores solares. **Química nova**, v. 30, p. 153-158, 2007.
- GOKULAKRISHNAA, R.; THIRUNAVUKKARASU, S.. Apitherapy: A valuable gift from honey bee. **J. Entomol. Zool. Stud**, v. 8, n. 5, p. 2317-2323, 2020
- Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. -- 1. ed. -- Brasília: ANVISA, 2004.
- HABERMANN, E. Apamin. **Pharmacology & therapeutics**, v. 25, n. 2, p. 255-270, 1984.
- HAN, S. M. et al. Effects of honeybee (*Apis mellifera*) venom on keratinocyte migration in vitro. **Pharmacognosy magazine**, v. 9, n. 35, p. 220–226, 2013.
- KUMAR, M. et al. Apitherapy and periodontal disease: Insights into in vitro, in vivo, and clinical studies. **Antioxidants (Basel, Switzerland)**, v. 11, n. 5, p. 823, 2022.
- KUNITZ, A. G. Melitina proveniente do veneno de abelha: processo de purificação, aplicação e avaliação econômica. Dissertação (**Mestrado em Engenharia Química**) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis (Brasil), 2015.
- KUREK-GÓRECKA, A. et al. Bee venom in wound healing. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 26, n. 1, p. 148, 2020.
- LEÃO DEMOLIN LEITE, G. .; LEITE ROCHA, S. . Apitoxina. **Revista Unimontes Científica**, [S.l.],v.7,n.1,p.115–126, 2020.Disponível em: <https://www.periodicos.unimontes.br/index.php/unicientifica/article/view/2422>. Acesso em: 17 jul. 2024.
- LIMA, A. R. et al. Avaliação in vitro da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico de folhas de bardana. **Revista brasileira de farmacognosia: orgao oficial da Sociedade Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 4, p. 531–536, 2006.
- MANOCHIO PINTO, T. V. Desenvolvimento de cosméticos multifuncionais: talco líquido fotoprotetor. 2020. **Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia)** – Universidade de Uberaba, Uberaba, 2020.
- MEDEIROS, K. A. DE. **Desenvolvimento de nanopartículas de quitosana contendo o peptídeo citolítico melitina para o tratamento in vitro e in vivo de células tumorais de mama**. [s.l.] Biblioteca Central da UNB, 2019
- MICHENER, C. D. **The bees of the world**. 2. ed. Baltimore, MD, USA: Johns Hopkins University Press, 2007.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução - RDC nº 30, de 1º de junho de 2012**. Disponível em:<[https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0030\\_01\\_06\\_2012.html](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0030_01_06_2012.html)>. Acesso em: 08 mar. 2024.
- MOTA, Fernanda Antunes. Formulação fotoprotetora à base de extrato de própolis verde com licenciamento de Know-how. 2023.
- MOURELLE, D. Estudos sobre atividade nociceptiva/antinociceptividade peptídeos isolados do veneno bruto de abelha *Apis mellifera*. 42 f. **Trabalho de conclusão de curso**, (Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas), Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2011.
- NASCIMENTO, A. J. DA S.; DA SILVA, F. G. M.; BONACHELA, F. S. A apiterapia e o veneno da abelha / Apitherapy and bee poison. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 9, p. 92142–92150, 2021.
- OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH•: estudo de revisão. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v. 17, n. 1, p. 36–44, 2015.
- OSTROSKY, E. A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista**

**brasileira de farmacognosia: orgao oficial da Sociedade Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301–307, 2008.

PICOLI, T. et al. SENSIBILIDADE DE LINHAGENS CELULARES FRENTE À MELITINA ISOLADA DE VENENO DE ABELHA. **Science and Animal Health**, v. 4, n. 2, p. 101, 2017.

RAMALHO, Wesley Crispim. Análise físico-química, atividade antioxidante e determinação de compostos fenólicos do mel e do pólen apícola da abelha *Apis Mellifera* comercializados no sertão paraibano. 2018. 32 f. **Artigo (Mestrado Profissional em Sistemas Agroindustriais)** - Programa de Pós-Graduação em Sistemas Agroindustriais, Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar, Universidade Federal de Campina Grande, Pombal, Paraíba, Brasil, 2018.

RATCLIFFE, N. A. et al. Insect natural products and processes: New treatments for human disease. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 41, n. 10, p. 747–769, 2011.

RIOS, A. R. et al. Dermatite atópica: um olhar sobre os tratamentos atuais. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 13, n. 6, p. e7595, 2021.

SÁ, F. A.; SOUSA, P. H. A. Defensividade de abelhas *Apis mellifera* L. africanizadas. **REVISTA CIENTÍFICA DE MEDICINA VETERINÁRIA**, v. 32, p. ISSN 1679-7353, 2019.

SANTOS, R. A. T.; MIKITO, L. B. . Study on biological activity of melitin and apamin. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 12, n. 4, p. e5912440897, 2023.

DOI:10.33448/rsd-v12i4.40897. Disponível

em:<https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/40897>. Acesso em: 12 mar. 2024

SAYRE, R. M. et al. A COMPARISON OF *IN VIVO* AND *IN VITRO* TESTING OF SUNSCREENING FORMULAS. **Photochemistry and photobiology**, v. 29, n. 3, p. 559–566, 1979.

SCHALKA, S.; REIS, V. M. S. DOS. Fator de proteção solar: significado e controvérsias. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 86, n. 3, p. 507–515, 2011.

SILVA, F. G. M.; MARTINS, E. A.; NARDI JUNIOR, G. Estudo sobre a extração da apitoxina da espécie *Apis mellifera*. **VIII JORNACITEC-Jornada Científica e Tecnológica**. 2019.

DA SILVA, P. H. S. et al. **Análise do fator de proteção solar em extratos glicólicos e óleos fixos de plantas da Amazônia**. Anais do Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica - Cobeq IC 2015. **Anais...**São Paulo: Editora Edgard Blücher, 2015.

SOARES, Caroline Leal Rodrigues. Avaliação da atividade cicatrizante in vitro e in vivo do extrato hidroalcoólico de *Laguncularia racemosa* (L) CF Gaertn. 2018. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Pernambuco.

SOBRAL, Filipa et al. Caracterização química e propriedades bioativas de amostras de veneno de abelha obtidas no Nordeste de Portugal. **Revista das Ciências Agrárias**, 2017.

TABTILA, U. PENGARUH GEL APITOXIN SENGAT LEBAH MADU *Apis mellifera* TERHADAP ANGIOGENESIS PADA FASE PROLIFERASI PENYEMBUHAN LUKA GINGIVA (kajian in vivo). 2019. **Tese de Doutorado**. Universitas Gadjah Mada.

TOBAR, R. A. V.; CABRERA, B.; GÓNGORA, F. F. B. Apiterapia como modalidade terapéutica complementaria a la fisioterapia en pacientes con Artritis Reumatoide. **Revista Facultad Ciencias de la Salud: Universidad del Cauca**, v. 12, n. 1, p. 9-18, 2010.

VELASCO, M. V. R. *et al.* Novas metodologias analíticas para avaliação da eficácia fotoprotetora (in vitro) – revisão. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32, n. 1, 2011.

VIANA, G. A. *et al.* Antioxidant, genotoxic, antigenotoxic, and antineoplastic activities of apitoxin produced by *Apis mellifera* in Northeast, Brazil. **Ciencia rural**, v. 51, n. 4, 2021.

VIANA, G. A. Avaliação in vitro das atividades biológicas da apitoxina extraída de *Apis mellifera* do semiárido. **Repositório UFERSA**, 2015.

VIANA, G. A. *et al.* Efeito fotoprotetor, genoprotetor e antineoplásico da apitoxina da *apis mellifera* do semiárido brasileiro. **Repositório UFERSA**, 2019.

ZUCCO, A.; SOUSA, F. S. DE; ROMEIRO, M. DO C. Cosméticos naturais: uma opção de inovação sustentável nas empresas. **Brazilian Journal of Business**, v. 2, n. 3, p. 2684–2701, 2020.