

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

VICTÓRIA GALDINO MANTA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO DE GEOPRÓPOLIS DE *Melipona quadrifasciata*
quadrifasciata FRENTE À BACTÉRIAS DA MICROBIOTA CUTÂNEA**

PONTA GROSSA

2022

VICTÓRIA GALDINO MANTA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO DE GEOPRÓPOLIS DE *Melipona quadrifasciata*
quadrifasciata FRENTE À BACTÉRIAS DA MICROBIOTA CUTÂNEA**

***IN VITRO* EVALUATION OF THE ANTIMICROBIAL POTENTIAL OF THE
HYDROALCOHOLIC GEOPROPOLIS EXTRACT FROM *Melipona quadrifasciata*
quadrifasciata AGAINST CUTANEOUS MICROBIOTA BACTERIA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado como requisito para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientador(a): Prof. Dr. Maria Carolina de Oliveira Ribeiro

Coorientador(a): Prof. Me. Simone Bowles

PONTA GROSSA

2022



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es). Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

VICTÓRIA GALDINO MANTA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO DE GEOPRÓPOLIS DE *Melipona quadrifasciata*
quadrifasciata FRENTE À BACTÉRIAS DA MICROBIOTA CUTÂNEA**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação
apresentado como requisito para obtenção do título de
Bacharel em Engenharia de Bioprocessos e
Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do
Paraná (UTFPR).

Data de aprovação: 27/junho/2022

Maria Carolina de Oliveira Ribeiro
Doutorado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Simone Bowles
Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Alessandra Cristine Novak Sydney
Doutorado em Processos Biotecnológicos
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

PONTA GROSSA

2022

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Lizandra e Fernando, por todo o apoio e confiança que depositaram em mim.

Ao Vithor, por ser abrigo e conforto nos momentos em que mais precisei.

À minha orientadora, Prof. Dr. Maria Carolina Oliveira Ribeiro, por sempre estar disponível e por todo o conhecimento que me guiou a conquistar.

À minha coorientadora e inspiração, Prof. Me. Simone Bowles, por me mostrar o incrível mundo das abelhas e me fazer ter uma nova paixão na vida.

À Prof. Dr. Alessandra Novak Sydney pela disponibilidade em ler e fazer importantes considerações ao meu trabalho.

À Maria Fernanda Sousa, pela imensurável ajuda. Sem ela este trabalho não seria o mesmo.

The more I see, the less I know.
(RED HOT CHILI PEPPERS, 2006).

RESUMO

A conservação da diversidade das abelhas é uma questão de sustentabilidade, tendo importância ecológica, econômica e de segurança alimentar, pois elas são os polinizadores mais importantes para a reprodução das angiospermas. As abelhas sem ferrão, ou meliponíneos, são as produtoras exclusivas de geoprópolis, uma mistura de terra ou barro com secreções salivares, cera e exsudatos de vegetais, produto que vem despertando o interesse da comunidade científica nos últimos tempos devido às suas propriedades biológicas. Tendo em vista o surgimento de superbactérias resistentes a antibióticos e o problema de saúde mundial que isso está se tornando, terapias alternativas com produtos naturais estão ganhando força, caracterizando-se pela eficácia, baixo custo e riscos mínimos de efeitos adversos e resistência bacteriana. Assim, este trabalho objetivou caracterizar físico-quimicamente a geoprópolis *in natura* de *Melipona quadrifasciata quadrifasciata*, e avaliar o potencial antimicrobiano do extrato hidroalcoólico dessa geoprópolis frente *Cutibacterium acnes* e *Staphylococcus epidermidis*, bactérias protagonistas da microbiota cutânea. Para a caracterização físico-química foram realizadas análises de sólidos solúveis em etanol, teor de cinzas e umidade. Para a avaliação da atividade antimicrobiana do extrato de geoprópolis foi utilizada a metodologia de disco-difusão. O extrato foi testado em sua concentração inicial e em concentrações de 0,05%, 0,1%, 0,15%, 0,5% e 1,0%. Também foi formulada uma loção hidratante corporal a base de 1,5% de extrato de geoprópolis e foi avaliada a sua atividade antimicrobiana com relação às duas mesmas bactérias. Os resultados de sólidos solúveis em etanol apresentaram-se acima de 35%, estando em conformidade com a legislação brasileira para a própolis de *Apis mellifera*. Os teores de umidade e cinzas apresentaram valores médios $0,74 \pm 0,05\%$ e $48,72 \pm 17,60$, respectivamente. O primeiro estava dentro da legislação, que traz um máximo de 8% para teor de umidade. O teor de cinzas, em contrapartida, apresentou valores muito acima do recomendado, pois, segundo a legislação, esse teor não deve ultrapassar 5%. Notou-se a necessidade de atualizar a legislação existente para definir uma identidade e qualidade específicas para a geoprópolis de abelhas nativas. Com relação ao estudo do potencial antimicrobiano, os testes com extrato de geoprópolis na concentração inicial de 10% e 1,0%, e veiculado na loção hidratante, foram capazes de inibir efetivamente *C. acnes*, formando halos de inibição maiores que 7,5 mm. *S. epidermidis* demonstrou ser inibida pelo álcool, e a geoprópolis apresentou-se como coadjuvante nessa inibição. Ainda, *S. epidermidis* não apresentou crescimento microbiano quando testada com o cosmético. Concluiu-se que a geoprópolis apresenta significativa atividade antimicrobiana frente *C. acnes*, além de ser um produto apícola que ainda possui potencial a ser explorado.

Palavras-chave: abelhas sem ferrão; geoprópolis; microbiota cutânea; atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

The bee diversity conservation is a sustainability issue, having ecological, economical and food safety importance, because they are the main pollinators to the angiosperm reproduction. The stingless bees, or meliponines, are the exclusive geopropolis producers, a mix of mud or soil with salivary secretions, wax and plants exudates. This bee product has been arousing interest of scientific community due to its biological properties. In view of the spread of antibiotic resistant bacteria and the global health problem that it is becoming, alternative therapies with natural products are emerging, characterized by its effectiveness, low cost, the minimum risks against adverse effects and antimicrobial resistance. Thereby, this paper aimed to physico-chemically characterize *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* raw geopropolis, and evaluate the antimicrobial potential of hydroalcoholic geopropolis extract against *Cutibacterium acnes* and *Staphylococcus epidermidis*, bacteria that are protagonists of the skin microbiota. For the physico-chemical characterizations, ethanol soluble solids, ash and moisture content analysis were performed. For the evaluation of the antimicrobial activity of geopropolis extract, the methodology used was disk diffusion method. The extract was tested at its initial concentration and at 0,05%, 0,1%, 0,15%, 0,5% e 1,0% concentrations. A moisturizing body lotion based on 1,5% of geopropolis extract was also formulated and its antimicrobial activity against the two same bacteria was evaluated. The results of ethanol soluble solids were above 35%, in compliance with *Apis mellifera* propolis Brazilian legislation. Moisture and ash content presented medium values of $0,74 \pm 0,05\%$ and $48,72 \pm 17,60$, respectively. The first was within the legislation, which accepts a maximum of 8% for moisture content. On the other hand, the ash content presented values above the recommended, because, according to the legislation, the values must not exceed 5%. It was noted the need to update existing legislation to define a stingless bees geopropolis specific identity and quality. Regarding the antimicrobial potential study, geopropolis extract at the initial concentration of 10%, at 1,0% concentration, and used in the moisturizing lotion, were able to effectively inhibit *C. acnes*, forming inhibition halos larger than 7,5 mm. *S. epidermidis* demonstrated to be inhibited by alcohol, and geopropolis appeared as an adjuvant in this inhibition. Yet, *S. epidermidis* did not presented microbial growth when tested with the cosmetic. It was concluded that geopropolis has significant antimicrobial potential against *C. acnes*, in addition to being a bee product that still has potential to be explored.

Keywords: stingless bees; geoprópolis; skin microbiota; antimicrobial activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Fotografia 1 – <i>Melipona quadrifasciata quadrifasciata</i> (Mandaçaia)	18
Fotografia 2 – Geoprópolis de <i>Melipona quadrifasciata quadrifasciata</i> utilizada no trabalho.....	25
Figura 1 – Diagrama esquemático do preparo do extrato hidroalcoólico de geoprópolis.....	28
Fotografia 3 – Placas prontas para avaliação da atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico de geoprópolis	31
Figura 2 – Diagrama esquemático do procedimento para avaliação antimicrobiana.....	32
Fotografia 4 – Formulação da loção hidratante.....	33
Fotografia 5 – Visualização em microscópio das bactérias <i>C. acnes</i> (A) e <i>S. epidermidis</i> (B) após coloração de Gram.....	37
Fotografia 6 – Halos de inibição formados frente <i>S. epidermidis</i> (1) e <i>C. acnes</i> (2) com extrato hidroalcoólico de geoprópolis de Mandaçaia a 1,0% (m/v).....	40
Fotografia 7 – Resultado em triplicata da avaliação da atividade antimicrobiana da loção hidratante à base de extrato hidroalcoólico de geoprópolis frente <i>S. epidermidis</i>	41
Fotografia 8 – Halos de inibição formados frente <i>C. acnes</i> com a loção hidratante à base de extrato hidroalcoólico de geoprópolis	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentrações de geoprópolis no extrato hidroalcoólico	30
Tabela 2 – Características físico-químicas da geoprópolis de Mandaçaia	35
Tabela 3 – Diâmetro dos halos de inibição do álcool 70% frente <i>S. epidermidis</i> e <i>C. acnes</i>	38
Tabela 4 – Inibição efetiva da geoprópolis de <i>M. quadrifasciata quadrifasciata</i> frente <i>S. epidermidis</i> e <i>C. acnes</i> (diâmetros dos halos de inibição)	38
Tabela 5 – Inibição efetiva da loção hidratante a base de 1,5% de extrato hidroalcoólico de geoprópolis de <i>M. quadrifasciata quadrifasciata</i> frente <i>S. epidermidis</i> e <i>C. acnes</i>	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	Ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzenotiazolina-6-sulfônico
ANOVA	Análise de variância
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
MAPA	Ministérios da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à Meticilina
pH	Potencial Hidrogeniônico
RC	<i>Reinforced Clostridial</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

Mg	Magnésio
Ca	Cálcio
I	Iodo
K	Potássio
Na	Sódio
Cu	Cobre
Zn	Zinco
Fe	Ferro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	14
2.1	Objetivo geral.....	14
2.2	Objetivos específicos.....	14
3	JUSTIFICATIVA	15
4	REVISÃO DE LITERATURA	16
4.1	Própolis e geoprópolis.....	16
4.2	Pele	19
4.3	Microbiota cutânea.....	20
4.4	Resistência microbiana	23
5	METODOLOGIA	25
5.1	Obtenção da amostra de geoprópolis <i>in natura</i>	25
5.2	Caracterização físico-química da geoprópolis	25
5.2.1	Sólidos solúveis em etanol	26
5.2.2	Teor de umidade	26
5.2.3	Cinzas	27
5.3	Preparo do extrato hidroalcoólico de geoprópolis.....	27
5.4	Cepas utilizadas	28
5.5	Coloração de Gram	29
5.6	Avaliação da atividade antimicrobiana.....	29
5.7	Loção hidratante corporal	32
5.8	Análise estatística	33
5.9	Aspectos éticos e legais	34
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
6.1	Caracterização físico-química da geoprópolis	35
6.2	Coloração de Gram	36
6.3	Avaliação da atividade antimicrobiana.....	37
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	44
	REFERÊNCIAS	45

1 INTRODUÇÃO

A conservação da diversidade das abelhas é uma questão de sustentabilidade, tendo importância ecológica, econômica e de segurança alimentar, devido ao serviço de polinização que elas prestam em ambientes naturais e agrícolas (SANTOS *et al.*, 2021). As abelhas são os polinizadores mais importantes para a reprodução das angiospermas e algumas espécies apresentam uma vantagem sobre as demais, sua sociabilidade. Apenas 5% (cinco por cento) das abelhas vivem em colônias organizadas, mas, em contrapartida, essas são as mais conhecidas do público em geral, sendo representadas pela abelha africanizada com ferrão (*Apis mellifera*) e pelas abelhas nativas sem ferrão, como Jataí (*Tetragonisca angustula*), Mandaçaia (*Melipona quadrifasciata*), Uruçu (*Melipona scutellaris*), entre outras.

As abelhas nativas, também chamadas “indígenas” ou “silvestres”, são os meliponíneos, representados por mais de quinhentas espécies sociais descritas (OSTROVSKI, 2019). Elas destacam-se devido a sua fácil domesticação (não apresentam ferrão funcional e possuem baixa agressividade), produção de mel, própolis e geoprópolis, captação de pólen e são responsáveis pela reprodução de 40% (quarenta por cento) a 90% (noventa por cento) de vegetais dependentes da polinização cruzada em florestas tropicais (LOPES, 2019). São habitantes dos trópicos, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do planeta, sendo encontradas na América do Sul, América Central, sul da América do Norte, África, sudeste da Ásia e norte da Oceania (LAVINAS *et al.*, 2019). Devido a isso, no Brasil, estima-se que existam duzentas e quarenta e cinco espécies de abelhas sem ferrão, distribuídas em vinte e nove gêneros (SANTOS *et al.*, 2021).

Os meliponíneos são dependentes do ambiente onde vivem, organizam-se em colônias permanentes e populosas, apresentam comportamento de recrutamento e armazenam uma grande quantidade de alimento (AVILA, 2019). Em geral, eles têm tamanho pequeno a médio, possuem ferrão atrofiado – por isso são inaptos a ferocar – e apresentam hábitos de nidificação variados e com grande complexidade estrutural.

As colônias são naturalmente localizadas em cavidades pré-existentes e podem estabelecer-se de forma aérea ou subterrânea, como em troncos e galhos ocos e/ou raízes de árvores, fendas de rochas, cavidades nos solos e interiores de formigueiros e cupinzeiros abandonados (SILVA; PAZ, 2012). Algumas espécies

podem nidificar em cavidades artificiais, como paredes, frestas de muros e dejetos ocos (RIBEIRO, 2017). As colônias são geralmente constituídas de cera, barro e resina vegetal. Algumas espécies utilizam a própolis e a geoprópolis (mistura de terra com resina vegetal e cera) para impermeabilização do ninho e vedação de frestas (BUDOIA, 2019). Outros materiais, como detritos vegetais e, até mesmo, fezes secas de outros animais, também podem ser utilizados no processo de nidificação (SILVA; PAZ, 2012).

As abelhas precisam ser preservadas devido a sua grande relevância ecológica, porém, ações antrópicas, como desmatamento, queimadas, uso indiscriminado de agrotóxicos e coleta predatória do mel, estão trazendo riscos a esses animais (RIBEIRO, 2017). Segundo Silva e Paz (2012), estima-se que, das espécies de abelhas sem ferrão conhecidas no Brasil, cem apresentam riscos potenciais de serem extintas. Em contrapartida, muitas dessas ainda não foram sequer estudadas e têm suas características biológicas desconhecidas. Tendo em vista a necessidade de conservação e entendimento acima desse grupo, é imprescindível o desenvolvimento de estudos sobre os meliponíneos e seus subprodutos, como a própolis e a geoprópolis, por exemplo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliação *in vitro* do potencial antimicrobiano do extrato hidroalcoólico de geoprópolis da abelha *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* frente a duas importantes bactérias da microbiota cutânea: *Cutibacterium acnes* e *Staphylococcus epidermidis*.

2.2 Objetivos específicos

- Estudar características físico-químicas da geoprópolis *in natura*;
- Obter o extrato hidroalcoólico da geoprópolis;
- Avaliar por metodologia *in vitro* o potencial antimicrobiano de diferentes concentrações de extrato da geoprópolis frente a diferentes bactérias da microbiota cutânea;
- Desenvolver uma loção hidratante corporal como veículo do extrato hidroalcoólico da geoprópolis;
- Avaliar a atividade antimicrobiana da loção hidratante frente às bactérias da microbiota cutânea.

3 JUSTIFICATIVA

A pele é um complexo ecossistema que suporta o crescimento de variados microrganismos comensais, ou seja, microrganismos que residem sem serem prejudiciais e que podem, inclusive, auxiliar na inibição de espécies patogênicas. Essa relação simbiótica de microrganismos presentes em nossa epiderme, recebe o nome de microbiota cutânea. Entretanto, quando essa microbiota entra em desequilíbrio, inúmeros distúrbios e patologias cutâneas podem ser desencadeados (SIVIERI *et al.*, 2021).

Para o tratamento desses distúrbios dermatológicos comumente são utilizados antibióticos sintéticos, porém, estudos vêm demonstrando a ocorrência de reações adversas nos pacientes e o aumento da resistência microbiana frente a esse tipo de medicamento. Devido a esses dois fatores, é crescente a busca por tratamentos alternativos, principalmente utilizando produtos naturais que tragam propriedades benéficas à estabilidade da microbiota cutânea (LYRA, 2019; SCALDAFERRI *et al.*, 2020; MELLO; LEITE, 2020).

Dentre esses produtos naturais, substâncias produzidas por abelhas têm despertado o interesse de muitos pesquisadores em decorrência de suas inúmeras propriedades terapêuticas, como: anti-inflamatórias, cicatrizantes, hipotensivas, antioxidantes, antimicrobianas, anestésicas e, até mesmo, anticancerígenas (BARROS; NETO; FONTELES, 2019; BUDOIA, 2019; SILVA *et al.*, 2019; MORMINO, 2020; RIBEIRO, 2017; TORRES *et al.*, 2018).

A geoprópolis é um produto apícola produzido essencialmente por abelhas nativas sem ferrão, constituída por uma mistura de barro e própolis, e é utilizada para vedar frestas, formar paredes e proteger a cavidade interna da colmeia do meio externo. Apesar de ainda não existirem muitas pesquisas e conhecimentos acerca desse produto, estudos recentes sobre a atividade antimicrobiana mostraram um interessante potencial da geoprópolis de *Melipona quadrifasciata* frente bactérias gram-positivas e gram-negativas (BUDOIA, 2019).

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Própolis e geoprópolis

A própolis é uma substância preparada pelas abelhas com o intuito de proteger, reparar e impermeabilizar a colmeia. Além disso, ela também age contra a ação de microrganismos devido às suas propriedades antimicrobianas (LAVINAS *et al.*, 2019). É uma mistura de pólen, resina, exsudatos de plantas e enzimas salivares (BONAMIGO *et al.*, 2017).

Mais de 300 compostos químicos de interesse já foram identificados em própolis de diferentes regiões, como flavonoides, terpenoides, ácidos aromáticos, óleos essenciais, ésteres, aminoácidos e inúmeros outros constituintes (MORMINO, 2020; REIS *et al.*, 2019). Atividades antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, hipotensiva, cicatrizante, anestésica, imunomoduladora e antitumoral são algumas das atividades biológicas decorrentes da complexa composição química da própolis (BARROS; NETO; FONTELES, 2019; BUDOIA, 2019; SILVA *et al.*, 2019; MORMINO, 2020; RIBEIRO, 2017; TORRES *et al.*, 2018). Na própolis brasileira, a atividade antimicrobiana está associada à presença de ácidos p -cumáricos e diterpenos (LIMA, 2015). Além disso, minerais como Mg, Ca, I, K, Na, Cu, Zn e Fe, e vitaminas A, B1, B2, B6, C e E, também podem ser encontrados nessa substância (BARROS; NETO; FONTELES, 2019). Devido a todos esses benefícios, a própolis tem se destacado na busca por tratamentos alternativos com produtos naturais. No entanto, deve-se levar em consideração que a composição química e as propriedades da própolis podem sofrer grandes variações de acordo com a biodiversidade, época do ano, condições climáticas e espécie da abelha, fatores que justificam a vasta variedade existente no Brasil (RIBEIRO, 2017).

Muito utilizada por tribos indígenas como matéria-prima para fabricação de ferramentas e como dádiva em sepultamento, a geoprópolis, produzida exclusivamente por abelhas nativas, é uma mistura de terra ou barro com secreções salivares, cera e exsudatos de vegetais, conferindo características únicas ao produto (SANTOS *et al.*, 2017; FERREIRA, 2018). Mesmo diferindo na composição, a geoprópolis desempenha as mesmas funções da própolis na colmeia (LAVINAS *et al.*, 2019).

As abelhas nativas, também conhecidas por abelhas sem ferrão, indígenas, silvestres, ou meliponíneos, caracterizam-se pela ausência de ferrão funcional, um indicativo de baixa agressividade e fácil domesticação. Apresentam tamanho que varia de pequeno a médio (entre 0,2 e 2 cm), podem ser encontradas em regiões tropicais e subtropicais do planeta e apresentam hábitos de nidificação com grande complexidade estrutural, variando desde cavidades pré-existentes, como troncos e galhos ocos, fendas de rochas e interiores de formigueiros e cupinzeiros abandonados (SILVA; PAZ, 2012), a até cavidades artificiais, como paredes, frestas de muros e dejetos ocos (RIBEIRO, 2017).

Os meliponíneos são conhecidos pela sua produção de mel, cera, pólen, própolis e geoprópolis (FERREIRA, 2018), além de trazerem benefícios ecológicos, sendo responsáveis pela reprodução de 40% (quarenta por cento) a 90% (noventa por cento) de vegetais dependentes da polinização cruzada em florestas tropicais (LOPES, 2019). Apesar do interesse sobre as abelhas sem ferrão ter aumentado nos últimos tempos, ainda não existem muitos estudos sobre a geoprópolis e suas propriedades, quando comparado com a própolis de *Apis mellifera* (FERREIRA *et al.*, 2017).

A *Melipona quadrifasciata*, popularmente conhecida como Mandaçaia (Fotografia 1), é uma abelha robusta que mede em torno de 8 a 12 milímetros. Divide-se em duas subespécies: *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* e *Melipona quadrifasciata anthidioides*. A subespécie *M. quadrifasciata quadrifasciata* é encontrada em regiões frias e de grande altitude do Brasil (Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e São Paulo), já a *M. quadrifasciata anthidioides* existe em regiões com temperaturas mais altas (Pernambuco, Bahia, Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e Rio de Janeiro) (AVILA, 2019; OSTROVSKI, 2019; SILVA; PAZ, 2012). O mel produzido por essa espécie tem uma produção de aproximadamente 3 litros de mel/colmeia/ano (LIMA, 2015). Ainda, o produto que desperta o maior interesse dos pesquisadores quando se trata de *M. quadrifasciata* é a sua geoprópolis (FERREIRA, 2019).

Fotografia 1 – *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* (Mandaçaia)



Fonte: A autoria própria (2021)

A presença de terpenoides, ácidos fenólicos, flavonoides, taninos hidrolisáveis, alcaloides e ácidos graxos na geoprópolis pode relacionar-se às propriedades biológicas desse produto, como as atividades antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, antimutagênica, antitumoral e imunomoduladora (SANTOS *et al.*, 2017; RIBEIRO, 2017). Como a geoprópolis apresenta terra em sua composição, há a necessidade do desenvolvimento de substâncias que ajam contra microrganismos que possam vir a contaminar a colmeia.

Torres *et al.* (2018) investigaram a atividade antimicrobiana do extrato etanólico das geoprópolis de *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* (Mandaçaia) e *Tetragonisca angustula* (Jataí), contra bactérias gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 23883) e gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923), *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Nesse estudo, as bactérias gram-positivas apresentaram maior sensibilidade do que as bactérias gram-negativas frente

aos dois extratos. Além disso, o extrato de geoprópolis de *M. quadrifasciata* apresentou-se mais potente e eficaz, com valores de concentração inibitória mínima (MIC) mais baixos para todas as bactérias testadas.

Santos *et al.* (2017) estudaram as atividades antimicrobiana de extratos aquosos e hidroalcoólicos das geoprópolis de *M. quadrifasciata* e *T. angustula* existentes em Santa Catarina. O extrato hidroalcoólico da geoprópolis de *M. quadrifasciata* apresentou as melhores atividades antimicrobianas contra *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, quando comparado com os outros extratos testados.

Budoia (2019) traz pesquisas sobre as atividades antibacteriana e antifúngica da geoprópolis de *M. quadrifasciata*. Os estudos demonstraram atividade frente bactérias gram-negativas, como *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, bactérias gram-positivas, como *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*, e fungos, como *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*, incluindo cepas resistentes a antimicrobianos.

Segundo Ostrovski (2019), no Estado do Paraná, a Mandaçaia é classificada como “criticamente em perigo de extinção”. Com o objetivo de destacar a sua importância ambiental e, conseqüentemente, diminuir a escassez na natureza, é necessário conhecer sobre o potencial e a qualidade dessa espécie e de seus subprodutos. A partir do momento que se entende e se vê o valor que algo agrega às vidas, passa-se a dar a devida importância e cuidado que essa merece. Além disso, expandir o conhecimento sobre abelhas nativas faz com que a sociedade mude a visão e o “medo” intrínseco que existe relacionado a abelhas como um todo.

4.2 Pele

A pele é o maior órgão do corpo humano e constitui cerca de 16% do peso corpóreo. Sua estrutura divide-se em três camadas de tecidos: a) epiderme – é a parte superior e caracteriza-se por ser avascular, ou seja, não possui circulação sanguínea e linfática; b) derme – camada intermediária, onde localizam-se vasos, nervos, glândulas, raízes de pelos, fibras de colágeno e elastina. Protege o corpo de lesões mecânicas; c) hipoderme – camada mais profunda, altamente vascularizada, formada por tecido conjuntivo frouxo e células de gordura. Tem como funções o

armazenamento de energia, isolamento térmico, preenchimento de espaços internos e absorção de impactos (KIM; PARK; LEE, 2019; LYRA, 2019; CENTURIÃO *et al.*, 2021; MORMINO, 2020).

A pele, como um todo, atua na termorregulação do corpo humano, prevenindo a penetração de substâncias externas e a perda excessiva de líquidos. Ainda, constitui uma barreira de proteção contra atritos, desidratação, radiação ultravioleta e microrganismos (CENTURIÃO *et al.*, 2021).

O pH fisiológico da pele não é neutro, variando entre 4,5 e 6,0, a depender da idade e região do corpo. Esse pH levemente ácido contribui para a proteção microbiana na superfície corporal (RASCHE, 2014).

Todavia, a pele não exerce apenas o papel de barreira entre o organismo e o ambiente externo, ela também é um rico ecossistema composto por uma grande variedade de microrganismos. Esses microrganismos estão altamente relacionados com o bem-estar humano e com o desenvolvimento de doenças (LYRA, 2019).

4.3 Microbiota cutânea

Microbiota é o conjunto de fungos, bactérias e vírus que habitam o corpo humano, distribuindo-se pelas mucosas e partes do corpo que estão em contato com o meio externo. Ela pode ser dividida em transitória ou alóctone, representando microrganismos que não estabelecem uma colonização permanente e são definidos como contaminantes com pouca e/ou nenhuma capacidade de crescimento no ambiente cutâneo; e residente ou autóctone, sendo compreendida pelos microrganismos que colonizam de forma simbiótica, por períodos indefinidos, trazendo benefícios para o hospedeiro. Dentre esses benefícios, destaca-se o antagonismo microbiano, ou seja, a microbiota é capaz de impedir a colonização de microrganismos patógenos por meio da produção de substâncias nocivas, competição por nutrientes, sítios de adesão e alterações ambientais, como pH e disponibilidade de oxigênio (SIVIERI *et al.*, 2021).

A pele é o órgão humano mais exposto às mudanças ambientais e estresses, no entanto atua como uma complexa barreira fisiológica que tem como uma de suas funções manter a homeostase interna e proteger o organismo humano de patógenos oportunistas, por meio de um ecossistema microbiano dinâmico e complexo (BROWN;

HORSWILL, 2020; SIVIERI *et al.*, 2021). A esse diversificado ecossistema dá-se o nome de microbiota cutânea. Os microrganismos residentes, além do antagonismo microbiano, são responsáveis pela produção de sebo, que protege da desidratação transepidermal e tem ação antifúngica e antibacteriana. Os transitórios não residem permanentemente na pele e persistem por períodos intermitentes. Entretanto, mediante desequilíbrios na microbiota cutânea, ambos os tipos de microrganismos podem ser patogênicos, ou seja, qualquer alteração na microbiota pode resultar no desenvolvimento de doenças causadas por microrganismos (SIVIERI *et al.*, 2021).

Devido às grandes variações que a pele sofre ao longo de sua extensão, há a formação de diferentes nichos em diferentes localizações, possibilitando o desenvolvimento de diferentes espécies bacterianas (SIVIERI *et al.*, 2021). Estima-se que a cada centímetro quadrado de pele exista até um bilhão de bactérias (LYRA, 2019). De acordo com Sivieri e colaboradores (2021), em áreas mais sebáceas do corpo, como face e tronco, há predominância de *Cutibacterium spp.* e *Staphylococcus spp.* Regiões mais úmidas, como axilas, dobras dos cotovelos e joelhos, caracterizam-se pelo predomínio de *Corynebacterium spp.*, *Staphylococcus spp.* e *Betaproteobacteria spp.* Áreas mais secas apresentam maior diversidade de espécies, como mãos, antebraços e nádegas, onde podem ser encontradas bactérias dos filos Actinobacteria, Proteobacteria, Firmicutes e Bacterioidetes.

Apesar da variedade bacteriana existente, bactérias gram-positivas têm o seu destaque, como *Staphylococcus epidermidis* e *Cutibacterium acnes*, cujas, mesmo sendo consideradas comensais na pele, quando em disbiose, podem tornar-se patogênicas (SIVIERI *et al.*, 2021). Devido à crescente resistência das bactérias aos mais variados antibióticos existentes, essa patogenicidade torna-se um fator preocupante.

Cutibacterium acnes, a “bactéria da acne”, é um bacilo Gram-positivo, anaeróbio aerotolerante, que atua na fisiopatologia da acne liberando enzimas que contribuem com a ruptura da parede folicular e também estimula a resposta inflamatória. Aproximadamente 50% da microbiota total da pele do rosto e das costas é formada por essa bactéria e, ainda, *C. acnes* é o microrganismo anaeróbio encontrado em maior quantidade na pele (LYRA, 2019; BENTO, 2021). Os níveis de *C. acnes* alcançam valores máximos ao final da adolescência e estão presentes, principalmente, em regiões ricas em glândulas sebáceas, como a face, couro

cabeludo e tronco (ALVES *et al.*, 2017). As glândulas sebáceas produzem uma substância oleosa conhecida como sebo, cuja proporciona o desenvolvimento de anaeróbios facultativos, tais como *Cutibacterium acnes*. Essa bactéria, por meio da hidrólise de triglicerídeos existentes no sebo, libera ácidos graxos de cadeia curta, que, em situações de equilíbrio, contribuem para a manutenção do pH epidérmico (LYRA, 2019).

Segundo Mormino (2020), a acne é a doença crônica do folículo polissebáceo mais comum da pele humana. Foram identificados alguns fatores fundamentais para o surgimento da acne, dentre os quais pode-se citar a hiperprodução de sebo, hiperqueratinização folicular e o aumento da colonização por *C. acnes*. A Sociedade Brasileira de Dermatologia (2017) diz que a acne, apesar de ser mais frequente em adolescentes, também é bastante comum em adultos, principalmente em mulheres.

Estudos recentes mostraram que a carga de *C. acnes* é altamente similar em pacientes com problemas de acne e pacientes saudáveis. Com isso, foi possível descobrir que algumas cepas dessa bactéria são realmente comensais e contribuem para a pele, enquanto outras têm o potencial para atuar como patógenos, com uma maior virulência e poder inflamatório (DRÉNO *et al.*, 2018).

Staphylococcus epidermidis é uma bactéria Gram-positiva, aeróbia, que aparece como cocos dispostos em forma de “cachos de uva”. Representa mais de 90% das bactérias residentes da microbiota aeróbica da pele. Anteriormente, era considerada um microrganismo comensal da pele humana, porém, hoje em dia, caracteriza-se como um patógeno oportunista responsável por infecções equiparadas às desencadeadas por *Staphylococcus aureus*, além de representar a fonte mais comum de infecções em dispositivos médicos internos (LYRA, 2019).

Quando em desequilíbrio, está relacionada à ocorrência de dermatites atópicas (comumente relacionadas apenas com *S. aureus*), síndrome de *Netherton*, osteomelites, mediastinites, prostatites, infecções no trato urinário, infecções em implantes ortopédicos e próteses, e formação de biofilmes (BRESÓ *et al.*, 2017; BROWN; HORSWILL, 2020; SIVIERI *et al.*, 2021). Isso decorre do fato de *S. epidermidis* ser um colonizador permanente da pele humana e, embora as infecções ocasionalmente se desenvolvam para doenças fatais, a alta frequência e a dificuldade de tratamento representam um sério problema para os sistemas de saúde (LYRA, 2019).

Em menores quantidades, também podem ser encontradas na pele bactérias dos gêneros *Streptococcus*, *Micrococcus* e *Clostridium* na extensão da pele, além de fungos, como *Malassezia spp.* e *Candida spp.* (SIVIERI *et al.*, 2021).

Malassezia spp. são os fungos presentes em maior quantidade na microbiota cutânea, principalmente em locais com alta produção de sebo, como rosto, couro cabeludo, tórax e costas. Embora encontrado em peles saudáveis, essas leveduras também demonstram um potencial patogênico em determinadas condições, podendo gerar ou agravar doenças, como pitíriase versicolor (*M. globosa*, *M. sympodialis* e *M. furfur*), foliculite (*M. globosa*, *M. restricta* e *M. sympodialis*), dermatite seborreica (*M. furfur*) e dermatite atópica (*M. globosa*, *M. sympodialis* e *M. restricta*) (POTHMANN *et al.*, 2019; SAUNTE; GAITANIS; HAY, 2020).

Candida spp. coloniza superfícies epiteliais, como a mucosa oral e vaginal, o intestino e a pele (KÜHBACHER *et al.*, 2017). O aumento da colonização desse gênero de fungos é associado a doenças de pele, incluindo psoríase, dermatite atópica e candidíase mucocutânea crônica. Dentre as espécies de *Candida* pertencentes a microbiota da pele, como *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. orthopsilosis*, *C. albicans* é, frequentemente, a espécie responsável por infecções (KÜHBACHER; BURGER-KENTISCHER; RUPP, 2017). As infecções mais comuns causadas por *C. albicans* são: candidíase oral, popularmente conhecida por “sapinho”, bastante comum em bebês; e candidíase vulvovaginal, que afeta, aproximadamente, 75 milhões de mulheres por ano (WILSON, 2018).

4.4 Resistência microbiana

Segundo Lyra (2019), antimicrobianos ou antibióticos são compostos capazes de causar a morte ou inibir o crescimento de microrganismos, podendo ser sintéticos ou de origem natural. Quando são capazes de causar a morte de bactérias, classificam-se como bactericidas, e, quando promovem a inibição do crescimento de bactérias, são bacteriostáticos.

Levando em consideração os variados distúrbios desencadeados pelos diferentes microrganismos presentes na microbiota cutânea, um fator em comum deve ser destacado: a resistência microbiana, um problema mundial de saúde. Apesar do desenvolvimento de inúmeros antibióticos sintéticos e da necessidade de prescrição

médica para sua comercialização, seu uso indiscriminado permitiu o surgimento de superbactérias, as quais desenvolveram mecanismos para sobrevivência, como transferência de genes de resistência, mutações cromossômicas e formação de biofilmes. Como diversos antibióticos pertencem a uma mesma classe, quando um microrganismo desenvolve resistência a um medicamento, toda sua classe relacionada também é afetada (LYRA, 2019; SCALDAFERRI *et al.*, 2020). Além de reduzir a eficácia dos agentes antimicrobianos, a resistência dos microrganismos tende a aumentar a gravidade e incidência das infecções (COLLIGNON; MCEWEN, 2019).

Com o intuito de diminuir o uso de antibióticos, terapias alternativas vêm ganhando força, com destaque para produtos naturais e suas propriedades terapêuticas, os quais caracterizam-se pela eficácia, acessibilidade e baixo custo, além de apresentarem riscos mínimos frente a efeitos adversos e resistência bacteriana (MELLO; LEITE, 2020).

A indústria cosmética vem apostando no desenvolvimento de dermocosméticos para o tratamento de distúrbios cutâneos. Dermocosméticos referem-se a produtos que contêm substâncias ativas, as quais são capazes de causar modificações positivas e duradouras na pele (SCHORRO *et al.*, 2020), cujas características exigem comprovação de segurança e eficácia (ROCHA *et al.*, 2019). De acordo com Lyra (2019), emulsões tópicas são as preparadas com maior frequência, sendo os cremes muito utilizados como veículo para a incorporação de fármacos e produtos naturais com as mais variadas aplicabilidades.

Com base nisso, e na crescente tendência do uso de produtos naturais, substâncias produzidas por abelhas têm despertado o interesse de pesquisadores. Dentre elas, pode-se destacar a geoprópolis em decorrência de suas inúmeras propriedades terapêuticas e farmacológicas, como atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e antioxidante.

5 METODOLOGIA

5.1 Obtenção da amostra de geoprópolis *in natura*

A amostra de geoprópolis utilizada na pesquisa foi produzida por *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* (Mandaçaia) e coletada no Meliponário São Miguel, localizado na cidade de Ponta Grossa, Paraná, no dia 2 de outubro de 2021. Na Fotografia 2, é possível visualizar a amostra de geoprópolis *in natura* utilizada para o desenvolvimento do trabalho. Após obtida, essa amostra foi armazenada no escuro, em recipiente hermético e local fresco, com temperatura menor que 10°C.

Fotografia 2 – Geoprópolis de *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* utilizada no trabalho



Fonte: Autoria própria (2021)

5.2 Caracterização físico-química da geoprópolis

Devido à falta de legislações que padronizem a geoprópolis, esse produto e suas características foram baseados na Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), a qual trata da regulamentação de produtos apícolas produzidos por abelhas africanizadas *Apis*

mellifera (Apitoxina, Cera de Abelha, Geleia Real, Geleia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis) (BRASIL, 2001). Para a própolis, produto análogo à geoprópolis, existem requisitos físico-químicos para assegurar a qualidade, como perda por dessecação (umidade), cinzas, sólidos solúveis em etanol, entre outros.

As análises físico-químicas foram realizadas em triplicata de acordo com Dias *et al.* (2012), compreendendo sólidos solúveis em etanol, teor de umidade e cinzas.

5.2.1 Sólidos solúveis em etanol

Os sólidos solúveis da própolis são constituídos por materiais cerosos, bálsamos, óleos essenciais e derivados fenólicos (MATSUDA, 2006). Para determinação dos sólidos solúveis em etanol, foi pesado 1 g de geoprópolis e adicionado em 250 mL de etanol. A mistura foi agitada em agitador magnético por 30 minutos e, então, filtrada em papel filtro (DIAS *et al.*, 2012). O resíduo sólido restante no papel filtro foram os sólidos insolúveis, que foram pesados. Dessa forma, os sólidos solúveis foram determinados pela diferença entre o peso da amostra e o peso dos sólidos insolúveis. O resultado foi expresso em porcentagem, conforme equação 1 abaixo:

$$\text{Sólidos Solúveis (\%)} = \frac{PA-SI}{PA} \times 100 \quad (1)$$

Onde:

PA – Peso da amostra;

SI – Sólidos insolúveis;

SS – Sólidos solúveis.

5.2.2 Teor de umidade

Para a determinação da umidade, foram pesados 5 g de geoprópolis em cadinho de porcelana tarado. Em seguida, a amostra foi seca em estufa a 105°C por 4 horas, e resfriada em dessecador (DIAS *et al.*, 2012). A umidade foi calculada conforme a equação 2 e os resultados foram expressos em porcentagem.

$$Umidade (\%) = \frac{A1-A2}{A1} \times 100 \quad (2)$$

Onde:

A1 – massa da amostra inicial;

A2 – massa da amostra seca.

5.2.3 Cinzas

Para a análise de cinzas em base úmida, foram pesados 5 g de geoprópolis em cadinho de porcelana. Em seguida, a amostra foi incinerada em bico de *Bunsen* e calcinada em mufla a 550°C por 5 horas (DIAS *et al.*, 2012). O teor de cinzas foi calculado conforme a equação 3 e os resultados foram expressos em porcentagem.

$$Cinzas (\%) = \frac{m1-m2}{m0} \times 100 \quad (3)$$

Em que:

m₀ – massa da geoprópolis;

m₁ – massa do cadinho após a calcinação;

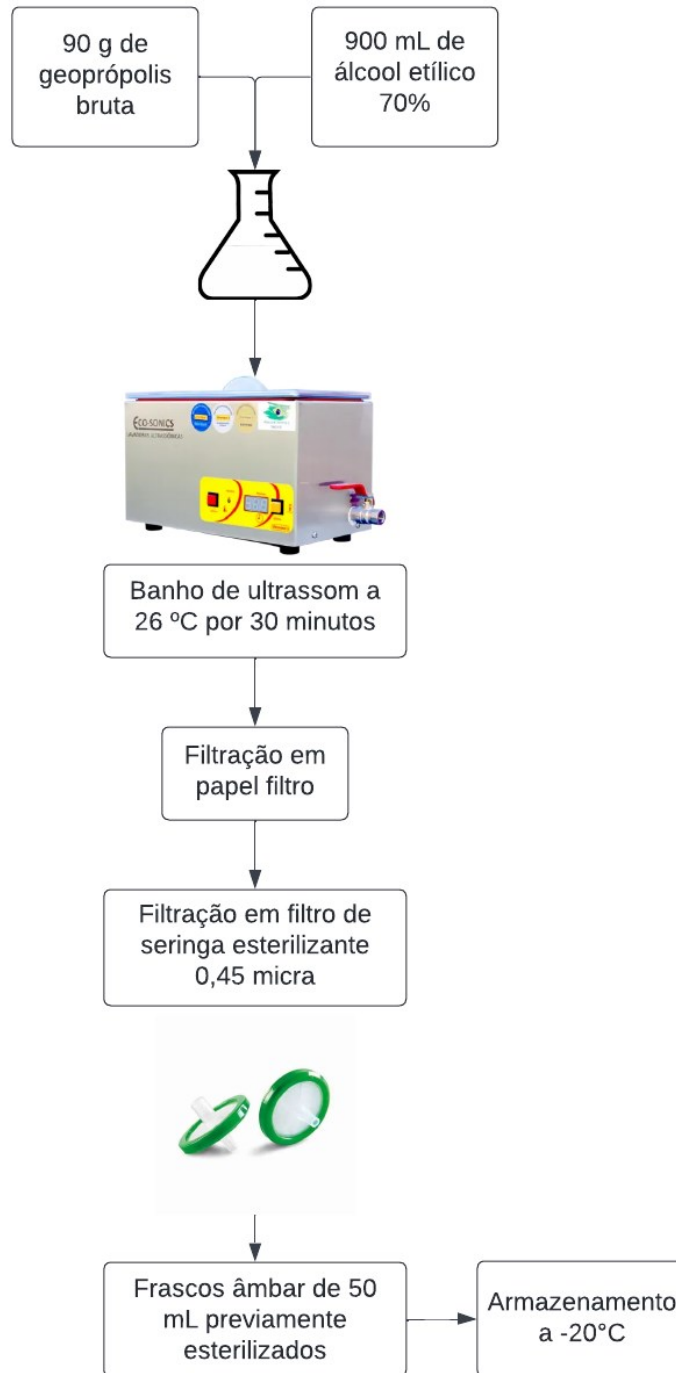
m₂ – massa do cadinho antes da calcinação.

5.3 Preparo do extrato hidroalcoólico de geoprópolis

Para o preparo do extrato hidroalcoólico da geoprópolis a uma concentração de 10%, 90 g de geoprópolis bruta foram colocados em um *erlenmeyer* contendo 900 mL de etanol 70%. A solução passou por um banho de ultrassom a 26°C durante 30 minutos. Então, a amostra foi filtrada em papel filtro e, em seguida, filtrada em filtro de seringa esterilizante de 0,45 µm, passando diretamente para frascos âmbar de 50 mL previamente esterilizados, garantindo a esterilidade do extrato. Os frascos com extrato foram armazenados a -20°C (FRAZÃO, 2017). O extrato hidroalcoólico da geoprópolis foi armazenado em frascos de vidro âmbar com o intuito de não perder suas propriedades devido à fotossensibilidade dos compostos bioativos. O diagrama

esquemático do procedimento para o preparo do extrato hidroalcoólico de geoprópolis pode ser visualizado na Figura 1.

Figura 1 – Diagrama esquemático do preparo do extrato hidroalcoólico de geoprópolis



Fonte: Autoria própria (2022)

5.4 Cepas utilizadas

As cepas utilizadas para os estudos foram *Cutibacterium acnes* ATCC 6919 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228. O meio de cultivo e manutenção utilizado para o crescimento de *C. acnes* foi o *Reinforced Clostridial* (RC), seguindo orientações do fornecedor, Fundação André Tosello.

Para o crescimento de *S. epidermidis* foi utilizado o caldo *Brain Heart Infusion* (BHI). Ambos os meios foram esterilizados em autoclave a 121 °C durante 15 minutos, seguindo as orientações do fabricante. As cepas foram incubadas em estufa a 35°C por 48 horas, sendo *C. acnes* cultivada em condições de anaerobiose.

5.5 Coloração de Gram

Para visualizar tanto *C. acnes*, quanto *S. epidermidis*, e garantir a confiabilidade microbiológica desses microrganismos, a técnica da coloração de Gram foi utilizada. Esse método simples e rápido permite a diferenciação de bactérias com diferentes estruturas de parede celular, por meio da coloração que essas adquirem após tratamento do esfregaço bacteriano com os reagentes cristal violeta, lugol, etanol-acetona e fucsina básica (SANTOS *et al.*, 2016).

5.6 Avaliação da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico da geoprópolis foi avaliada pelo método de disco-difusão descrito por Bona e colaboradores (2014). Previamente à realização do experimento, houve o preparo do inóculo por meio da reativação dos microrganismos. *C. acnes* foi reativada em ágar RC e *S. epidermidis* foi reativada em ágar BHI, com 48 horas de antecedência a cada experimento, respeitando as demandas de oxigênio de cada bactéria. Após reativadas, foram preparadas suspensões das culturas, diluindo os inóculos em solução salina 0,85% estéril, utilizando o ponto 0,5 de turbidez da escala *Mc Farland*, para obtenção de aproximadamente $1,5 \times 10^8$ Unidades Formadoras de Colônia (UFC/mL).

Para a avaliação da atividade antimicrobiana, o extrato foi testado na sua concentração inicial de 10%, denominada como solução mãe, e depois foi diluído em água destilada estéril até atingir as concentrações de 0,05%, 0,1%, 0,15%, 0,5% e 1,0%. Levando em consideração a concentração da solução mãe, as diluições

necessárias para o preparo das concentrações finais estão apresentadas na Tabela 1. Também foi avaliada a atividade antimicrobiana do álcool 70%, como controle, para verificar se a presença do etanol afetaria, ou não, o crescimento bacteriano (BARREIRAS *et al.*, 2020). O álcool foi testado na forma de 70% e diluído, mantendo a mesma proporcionalidade das concentrações de extrato preparadas.

Tabela 1 – Concentrações de geoprópolis no extrato hidroalcoólico

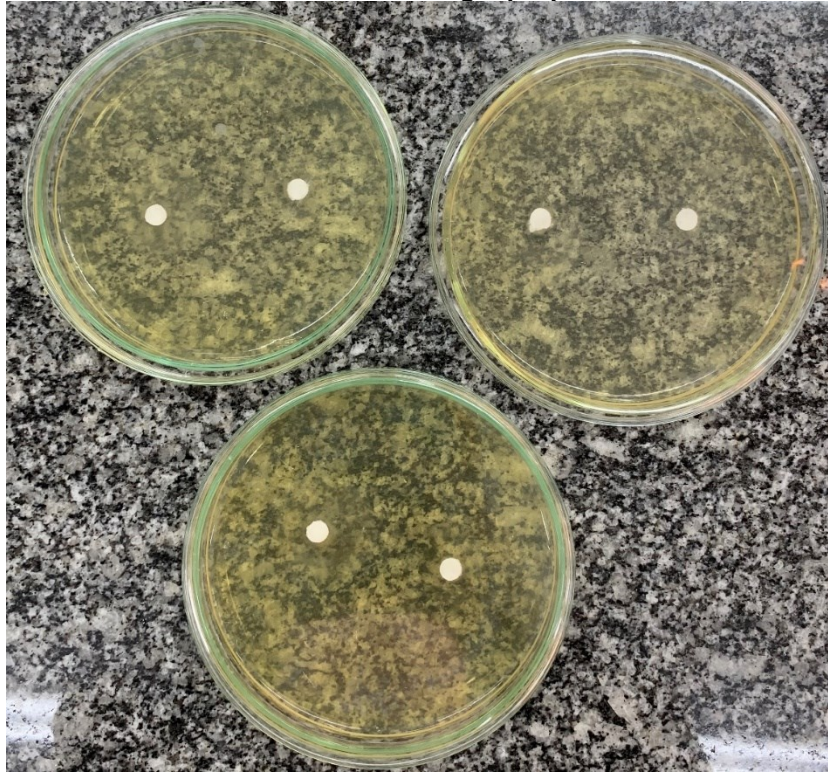
Denominação	Diluição do extrato em água estéril (% v/v)	Concentração final testada (% m/v)
Diluição 1	0,5	0,05
Diluição 2	1,0	0,1
Diluição 3	1,5	0,15
Diluição 4	5,0	0,5
Diluição 5	10,0	1,0

Fonte: A autoria própria (2022)

Os discos utilizados no teste foram previamente cortados em perfurador de papel, utilizando papel filtro qualitativo (gramatura de 250 g/m²). Os discos foram colocados em um frasco e esterilizados em autoclave a 121 °C durante 15 minutos e, em seguida, secaram em estufa de secagem por 24 horas.

Para o procedimento do estudo da atividade antimicrobiana, placas de Petri contendo os meios RC e BHI foram inoculadas pelas suspensões das culturas de *C. acnes* e *S. epidermidis* utilizando *swab* estéril para espalhar a suspensão por toda a superfície das placas. Os discos de papel estéreis foram mergulhados na solução a ser testada, por um tempo de 5 minutos e permaneceram escorrendo por 10 segundos. Em seguida, com pinça estéril, o disco foi aplicado sobre o meio já inoculado com a suspensão de cultura da bactéria a ser testada, conforme Fotografia 3.

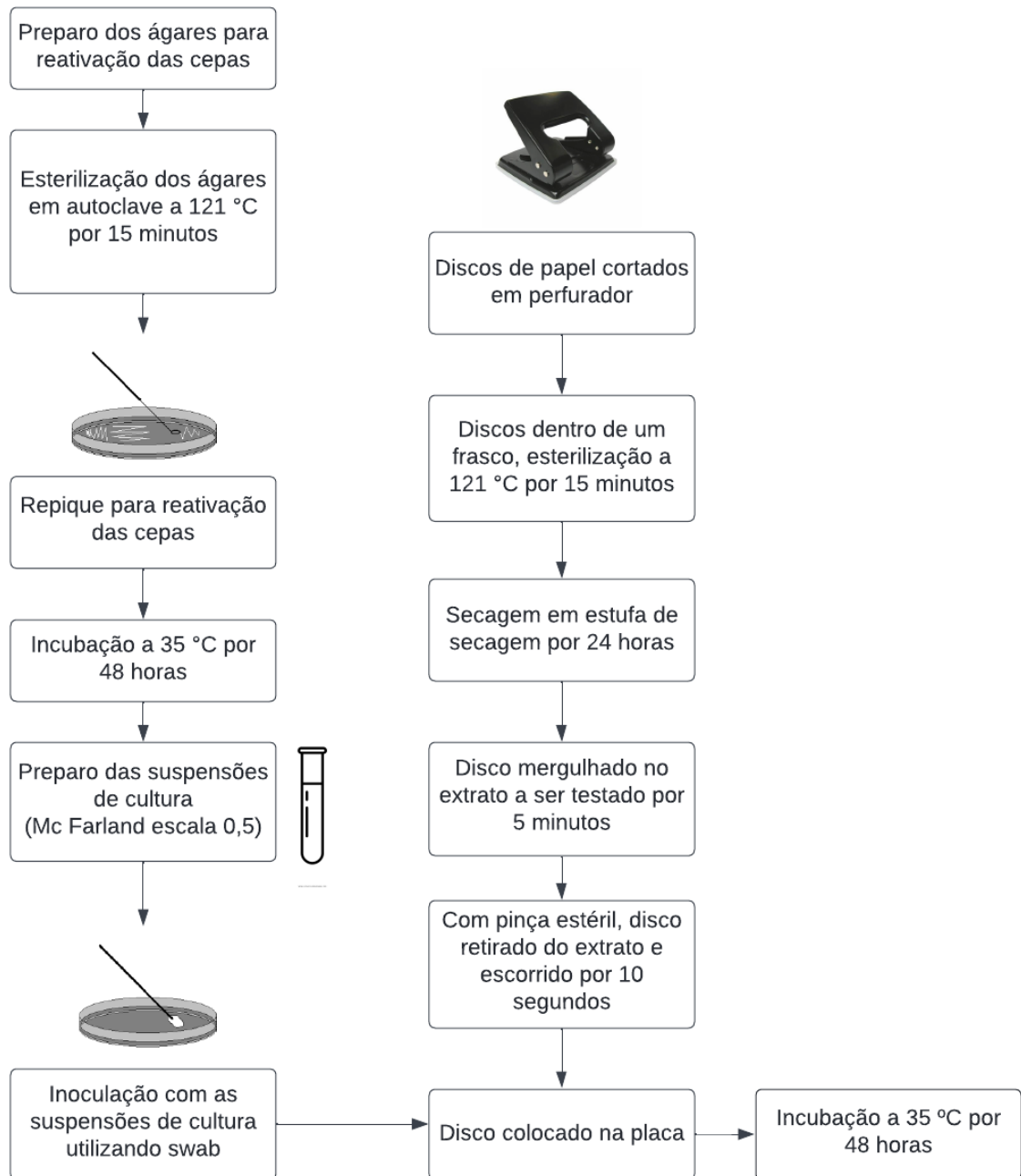
Fotografia 3 – Placas prontas para avaliação da atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico de geoprópolis



Fonte: Autoria própria (2021)

As placas foram incubadas a 35°C por 48 horas nas condições de aerobiose e anaerobiose para *S. epidermidis* e *C. acnes*, respectivamente. Os halos de inibição do crescimento microbiano foram medidos em milímetros. Na Figura 2, é possível visualizar o diagrama esquemático do procedimento para avaliação da atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico de geoprópolis.

Figura 2 – Diagrama esquemático do procedimento para avaliação antimicrobiana



Fonte: Autoria própria (2022)

A avaliação do potencial antimicrobiano foi realizada em triplicata para cada uma das diferentes concentrações testadas, tanto para *Staphylococcus epidermidis*, como para *Cutibacterium acnes*.

5.7 Loção hidratante corporal

Foram formulados, em farmácia de manipulação, 100 g de loção hidratante corporal veiculando o extrato hidroalcoólico de geoprópolis na forma de ativo antimicrobiano, a partir da solução mãe (concentração de 10%), como apresentado na Fotografia 4. O percentual desse ativo com relação ao total da formulação foi de 1,5%. Ao término do preparo do hidratante, o pH foi medido por meio de um peagômetro da marca AKSO.

Fotografia 4 – Formulação da loção hidratante



Fonte: Imagens disponibilizadas por Biofitus Farmácia de Manipulação (2022)

Para avaliar o desempenho bioativo do extrato de geoprópolis na formulação do creme, esse foi submetido à avaliação da atividade antimicrobiana frente às duas bactérias em estudo, reproduzindo a mesma metodologia de disco-difusão.

5.8 Análise estatística

Os resultados obtidos foram tratados no software *Excel*, por meio do qual, inicialmente, foi aplicado o teste Q para rejeição de valores críticos com um nível de confiança de 95%. Com os valores aceitos pelo teste Q, foi calculada a média e o desvio padrão de cada tratamento. Ainda, a análise de variância (ANOVA) foi aplicada nos resultados da avaliação da atividade antimicrobiana para visualizar se há diferença significativa entre *S. epidermidis* e *C. acnes* frente ao tratamento com geoprópolis. O nível de significância considerado foi de 0,05.

5.9 Aspectos éticos e legais

O trabalho foi submetido ao cadastro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) para possibilitar o acesso ao patrimônio genético, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos. O número de cadastro obtido foi A35AD08 com a finalidade de pesquisa e desenvolvimento tecnológico.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Caracterização físico-química da geoprópolis

A geoprópolis *in natura* de *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* apresentou resultados de sólidos solúveis em etanol, teor de umidade e teor de cinzas conforme Tabela 2. De acordo com a Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001, do MAPA, o requisito de solúveis em etanol para a própolis de *Apis mellifera* é de, no mínimo, 35%, e, para os teores de umidade e cinzas, no máximo, 8% e 5%, respectivamente (BRASIL, 2001).

Tabela 2 – Características físico-químicas da geoprópolis de Mandaçaia

Análise	Resultado (% em m/m)
Sólidos solúveis em etanol	49,48 ± 17,68
Teor de umidade	0,74 ± 0,05
Teor de cinzas	48,72 ± 17,60

Fonte: Autoria própria (2022)

Apesar das diferenças entre a própolis de abelhas com ferrão e a geoprópolis de abelhas nativas, a amostra apresentou uma média de 49,48 ± 17,68% de sólidos solúveis em etanol, variando entre 38,38% a 69,87%, mantendo-se em conformidade com o estabelecido pela legislação vigente (BRASIL, 2001). Com relação à própolis, Matsuda (2006) estudou 33 amostras do Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul do Brasil, e obteve resultados de sólidos solúveis que variaram de 35,82% a 63,32%. Ferreira (2019) estudou amostras de própolis de diferentes localidades do Rio Grande do Norte e chegou a um valor médio de 53,7% para sólidos solúveis. Não foram encontrados resultados de solúveis em etanol para amostras especificamente de geoprópolis, evidenciando a falta de estudos e informações ainda existentes quando se trata de abelhas sem ferrão e seus produtos.

Os teores de umidade e cinzas são essenciais para traçar um panorama geral da amostra, uma vez que, em produtos que possuem legislação específica, como no caso da própolis de *A. mellifera*, esses parâmetros podem ser indicativos de fraudes (FERREIRA, 2018). Altas concentrações de umidade possibilitam um ambiente propício para o crescimento de fungos, tornando o produto impróprio para consumo e comercialização (MATSUDA, 2006).

O teor de umidade da amostra variou de 0,69% a 0,78%, estando dentro do máximo de 8% em perda por dessecação recomendado pela legislação (BRASIL, 2001). Costa *et al.* (2018) avaliaram as características físico-químicas de sete amostras de geoprópolis produzida pela abelha nativa tiúba (*Melipona fasciculata* Smith) em Teresina, Piauí. A média de teor de umidade obtida das amostras foi de $1,89 \pm 0,35\%$. Oliveira *et al.* (2015) analisaram os teores de umidade e cinzas em amostras de geoprópolis e própolis de diferentes espécies de abelha sem ferrão da Amazônia e, dentre seis amostras, duas apresentaram resultados de umidade acima do exigido pela legislação – 8,45% e 8,57%. As outras quatro amostras apresentaram valores que variaram de 3,39% a 6,58%. Ferreira (2018) estudou geoprópolis de diferentes localidades de Santa Catarina, obtendo teores de umidade dentro do limite estabelecido para própolis de abelhas africanizadas em nove de dez amostras. Os resultados obtidos estavam entre 2,60% e 4,77%, com exceção da amostra fora do limite, a qual apresentou um teor de umidade de 8,80%.

As cinzas representam o teor de minerais totais distribuídos nas amostras de geoprópolis. O teor de cinzas obtido apresentou um valor médio de $48,72 \pm 17,60\%$ em base úmida. Altas concentrações de resíduo mineral fixo acontecem devido às grandes quantidades de terra e barro utilizados pelas abelhas sem ferrão para a produção de geoprópolis (COSTA *et al.*, 2018). No estudo do teor de cinzas, Oliveira *et al.* (2015) encontraram valores entre 75,40% e 85,43%. Ferreira (2018) obteve uma média de 62,21% de teor de cinzas para dez amostras. Dentre essas amostras, quatro eram de *Melipona quadrifasciata* e apresentaram valores de 66,01%, 51,97%, 65,96% e 58,32%, como resultados de concentração total de cinzas.

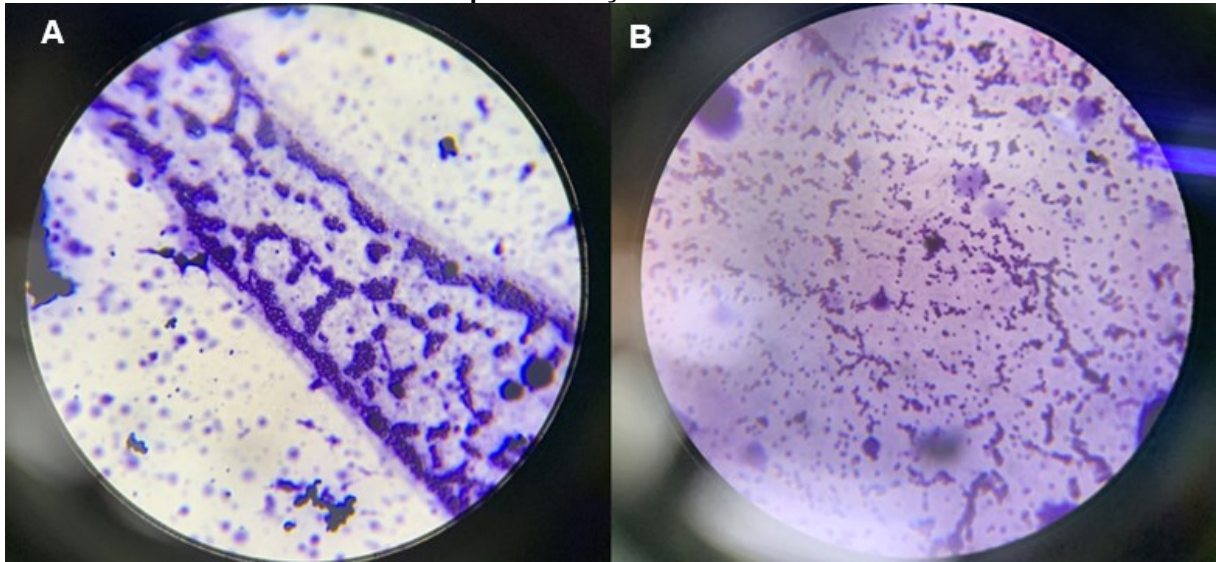
Deve-se lembrar que o padrão de qualidade da legislação foi desenvolvido especificamente para a própolis de *Apis mellifera* e a geoprópolis de abelhas nativas apresenta características e propriedades particulares. Com isso, entende-se a necessidade de atualizar a legislação existente para definir a identidade e qualidade de própolis e geoprópolis de abelhas nativas (BUDOIA, 2019).

6.2 Coloração de Gram

Os procedimentos de Gram apresentaram coloração azul violeta para *C. acnes* (Fotografia 5 – A) e para *S. epidermidis* (Fotografia 5 – B). As bactérias que

adquirem essa coloração azulada são denominadas Gram-positivas, e bactérias que atingem uma coloração vermelha são Gram-negativas (SANTOS *et al.*, 2016). Portanto, é possível afirmar que os dois microrganismos em estudo são Gram-positivos, estando de acordo com o encontrado na literatura.

Fotografia 5 – Visualização em microscópio das bactérias *C. acnes* (A) e *S. epidermidis* (B) após coloração de Gram



Fonte: A autoria própria (2021)

A visualização das lâminas em microscópio também possibilitou a identificação da diferença entre a morfologia das bactérias, e ambas se apresentaram conforme suas respectivas classificações trazidas em pesquisas. *Cutibacterium acnes* apresentou morfologia de bacilo, enquanto *Staphylococcus epidermidis* de cocos em arranjo de estafilococo.

6.3 Avaliação da atividade antimicrobiana

Inicialmente, a avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada com o álcool 70% puro e diluído em água destilada estéril tal qual o extrato de geoprópolis. Os resultados desse controle foram demonstrados na Tabela 3. *C. acnes* se demonstrou resistente a todas as concentrações de álcool testadas, não havendo a formação de halos de inibição.

Em contrapartida, para o álcool puro (70%) e para as diluições 1 a 5 ocorreu inibição de *S. epidermidis*, formando halos entre 6 e 8 milímetros de diâmetro. Devido a esse resultado, é possível inferir que o álcool apresenta influência sobre essa

bactéria nos testes com o extrato hidroalcoólico de geoprópolis. Portanto, para o estudo do potencial antimicrobiano do extrato, a inibição efetiva da geoprópolis foi calculada pela diminuição dos resultados alcançados com o extrato de geoprópolis em cada concentração e os respectivos resultados com o álcool 70%.

Tabela 3 – Diâmetros dos halos de inibição do álcool 70% frente *S. epidermidis* e *C. acnes*

Diluições	<i>S. epidermidis</i> (em mm)	<i>C. acnes</i> (em mm)
1	7,3 ± 1,5	-*
2	6,0 ± 0,0	-*
3	7,0 ± 0,0	-*
4	7,3 ± 0,8	-*
5	7,0 ± 1,0	-*
Puro	7,5 ± 0,5	-*

*As placas não apresentaram inibição microbiana.

Fonte: Autoria própria (2022)

O estudo foi, então, realizado com a solução mãe de extrato hidroalcoólico de geoprópolis (10%) e com as demais concentrações preparadas conforme Tabela 1. Dessa forma, foi possível visualizar qual a concentração mínima de geoprópolis necessária para se obter um resultado inibitório positivo. Os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 4, tanto para a *Staphylococcus epidermidis*, quanto para a *Cutibacterium acnes*.

Tabela 4 – Inibição efetiva da geoprópolis de *M. quadrifasciata quadrifasciata* frente *S. epidermidis* e *C. acnes* (diâmetros dos halos de inibição)

Concentrações	<i>S. epidermidis</i> (em mm)	<i>C. acnes</i> (em mm)
0,05%	-*	-*
0,10%	-*	-*
0,15%	-*	-*
0,5%	-*	-*
1,0%	1,00 ± 0,00	11,33 ± 3,05
10%	3,33 ± 2,40	26,00 ± 3,41

*As placas não apresentaram inibição microbiana.

Fonte: Autoria própria (2022)

Bona e colaboradores (2014) definiram que halos com diâmetro maior ou igual a 6 milímetros possuem atividade inibitória. As reproduções realizadas nas concentrações de 0,05%, 0,1%, 0,15% e 0,5% não apresentaram formação de halo de inibição e houve crescimento microbiano sem interferências. Em contrapartida, as

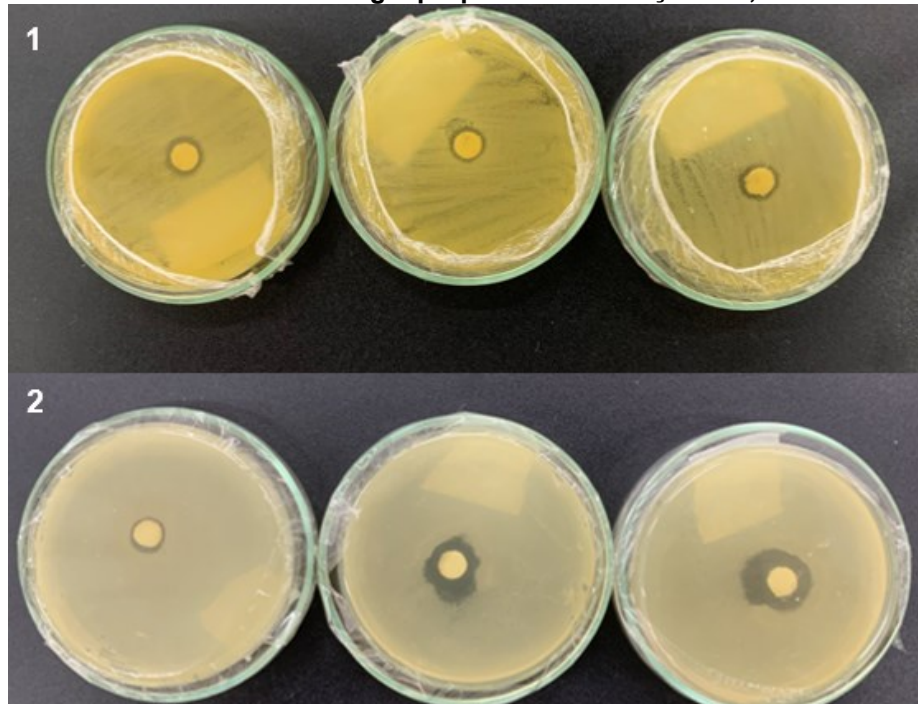
placas que continham os discos embebidos com extrato de geoprópolis nas concentrações de 1,0% e 10% apresentaram atividade antimicrobiana e formaram halos de inibição (Fotografia 6).

A inibição efetiva apresentada para *S. epidermidis* demonstrou que, apesar da formação de halos no estudo com o extrato, o responsável pela atividade antimicrobiana frente a essa bactéria foi o álcool. Nessa situação, a geoprópolis serviu para que a inibição do álcool frente *S. epidermidis* fosse aumentada. Além disso, ao ser aplicada a ANOVA entre os resultados alcançados para essa bactéria, foi obtido um valor-P de 0,24. Quando o valor-P é maior que o nível de significância (0,05) aceita-se a hipótese de que as médias das populações são iguais, ou seja, não há uma diferença significativa entre os tratamentos e pode ser concluído que a concentração de geoprópolis não interfere na atividade antimicrobiana perante *S. epidermidis*.

C. acnes não foi inibida pelo etanol em nenhuma das concentrações testadas. Por outro lado, a geoprópolis apresentou inibição efetiva frente à essa bactéria, obtendo valores médios de $11,33 \pm 3,05$ mm e $26,00 \pm 3,41$ mm, para as concentrações de 1,0% e 10% de extrato, respectivamente. Esses resultados demonstram que a geoprópolis é capaz de inibir o desenvolvimento de *C. acnes*. Com a aplicação da ANOVA nos dados resultantes, o valor-P obtido foi de 0,0004, sendo menor que o nível de significância. Portanto, entende-se que há uma diferença significativa entre os tratamentos e, com isso, é possível concluir que a inibição efetiva frente *C. acnes* é diretamente proporcional ao aumento da concentração de geoprópolis.

A análise de variância também foi aplicada entre os tratamentos das duas bactérias, a fim de verificar se há alguma diferença entre elas. O valor-P calculado foi de $1,61 \times 10^{-8}$, assim, as médias das populações são diferentes, o que caracteriza que existe uma diferença significativa entre *C. acnes* e *S. epidermidis* com relação à inibição causada pela geoprópolis.

Fotografia 6 – Halos de inibição formados frente *S. epidermidis* (1) e *C. acnes* (2) com extrato hidroalcoólico de geoprópolis de Mandaçaia a 1,0%



Fonte: Autoria própria (2021)

Em formulações de loções e cremes hidratantes, leites de limpeza, géis e pós-solares, a concentração de extrato de geoprópolis deve estar em um intervalo entre 1% e 10%. Quanto maior a proporção, maior é o potencial antimicrobiano, desde que a formulação permaneça estável e homogênea (SANTOS *et al.*, 2015; FRAZÃO, 2017). Tendo isso em vista, foi preciso estudar se o extrato, quando em veículo cosmético, apresentaria alguma atividade inibitória frente às bactérias. Visto que o extrato de geoprópolis na concentração de 10% obteve maior atividade antimicrobiana, essa solução foi a utilizada para o desenvolvimento da loção hidratante.

O pH obtido ao final da formulação foi de 6,3. Conhecer e acompanhar o pH do produto é um fator de grande importância, pois relaciona-se a modificações na estabilidade do cosmético e pode ser um indicativo de degradação (MORMINO, 2020). Além disso, deve-se levar em consideração que o pH fisiológico da pele varia entre 4,5 e 6,0, contribuindo para a formação da barreira microbiana na superfície do corpo (RASCHE, 2014). Em razão do pH obtido para a loção hidratante formulada ser similar ao pH natural da pele, entende-se que essa formulação não causará problemas de desequilíbrio na microbiota cutânea, quando se tratando de acidez e/ou alcalinidade.

O estudo da atividade antimicrobiana da loção hidratante a base de extrato hidroalcoólico de geoprópolis apresentou resultados conforme a Tabela 5. As placas que continham a suspensão da cultura de *Staphylococcus epidermidis* não apresentaram crescimento microbiano mesmo após cinco dias de incubação. Esse resultado pode ser um indicativo de que a loção foi capaz de inibir o crescimento bacteriano por completo nas placas, visto que nenhuma das três amostras apresentou a formação de colônias (Fotografia 7), ou ainda, pode significar um resultado inconclusivo.

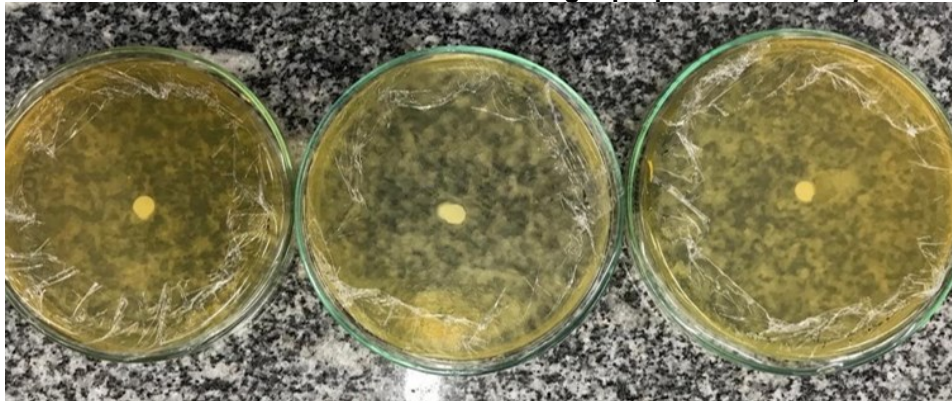
Tabela 5 – Inibição efetiva da loção hidratante a base de 1,5% de extrato hidroalcoólico de geoprópolis de *M. quadrifasciata quadrifasciata* frente *S. epidermidis* e *C. acnes*

Amostra	<i>S. epidermidis</i> (em mm)	<i>C. acnes</i> (em mm)
Loção hidratante (1,5% de geoprópolis)	NC ^a	7,5 ± 0,0

^aNão houve crescimento microbiano.

Fonte: Autoria própria (2022)

Fotografia 7 – Resultado em triplicata da avaliação da atividade antimicrobiana da loção hidratante à base de extrato hidroalcoólico de geoprópolis frente *S. epidermidis*

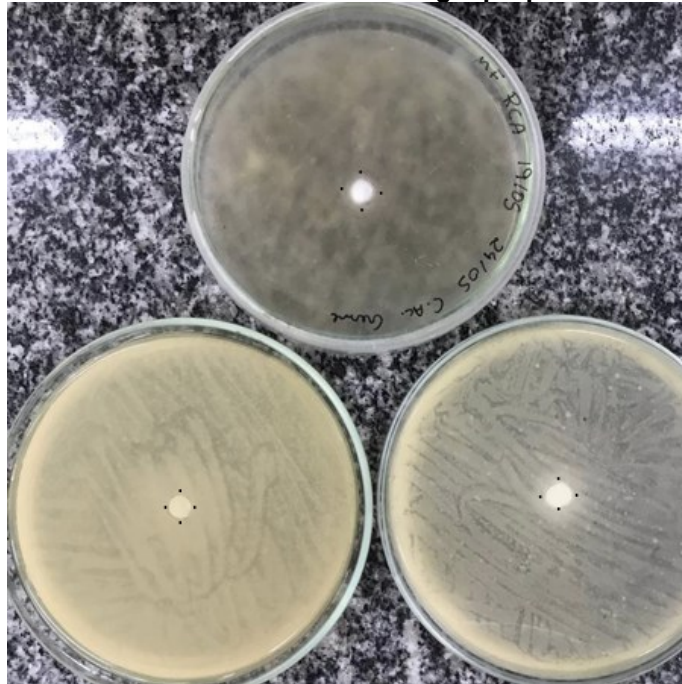


Fonte: Autoria própria (2022)

Com relação aos testes com o hidratante frente *Cutibacterium acnes*, houve a formação de halos de inibição com diâmetro médio de 7,5 mm (Fotografia 8), ou seja, a geoprópolis apresentou inibição efetiva sobre essa bactéria, quando em veículo cosmético. Entretanto, devido aos variados componentes que fazem parte da formulação e que podem interferir sobre a bactéria, o potencial antimicrobiano foi menor, se comparado com os resultados do estudo com apenas com o extrato de geoprópolis. Deve-se salientar que o extrato foi utilizado e avaliado na formulação como um ativo antimicrobiano, e não como um conservante para o cosmético. A

formulação por si só já possui em sua composição ingredientes específicos que agem como conservante para o sistema.

Fotografia 8 – Halos de inibição formados frente *C. acnes* com a loção hidratante à base de extrato hidroalcoólico de geoprópolis



Fonte: Autoria própria (2022)

Todos os resultados demonstraram uma diferença significativa entre *S. epidermidis* e *C. acnes*. *C. acnes* foi inibida efetivamente pela geoprópolis, apresentando valores acima de 7,5 mm, tanto como extrato quanto como loção hidratante. O próximo passo, então, seria acompanhar a estabilidade dessa atividade antimicrobiana. Dessa forma, é possível visualizar se ocorreu alguma alteração dessa característica no decorrer do tempo e, se sim, é possível definir qual o prazo máximo de utilização da formulação para garantir o resultado proposto. *S. epidermidis* foi inibida majoritariamente pelo álcool e não apresentou crescimento quando testada com o hidratante, sendo necessária a repetição do teste com maiores concentrações de geoprópolis, a fim de verificar se a bactéria apresentaria inibição efetiva por esse produto.

Em paralelo, ainda há a possibilidade de testar mudanças na concentração de extrato hidroalcoólico de geoprópolis utilizado para a formulação do hidratante, considerando o limite máximo de 10%, e prestando uma atenção especial à garantia da estabilidade e homogeneidade do veículo cosmético. A avaliação da atividade

antimicrobiana deve ser reproduzida para todas as diferentes concentrações formuladas, assim, pode-se ter um comparativo da influência que a geoprópolis terá frente *Staphylococcus epidermidis* e *Cutibacterium acnes*, quando veiculada em um cosmético.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A geoprópolis de *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* apresentou potencial antimicrobiano efetivo frente *Cutibacterium acnes*. Esse potencial foi visualizado para diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico de geoprópolis e, ainda, quando esse foi veiculado em loção hidratante corporal, reiterando a sua eficácia.

Os estudos com *Staphylococcus epidermidis* demonstraram que o principal responsável pela atividade antimicrobiana sobre essa bactéria foi o álcool. Avaliar o aumento nas concentrações de geoprópolis pode fazer com que esse potencial seja alterado.

A análise estatística demonstrou haver diferença significativa no efeito antimicrobiano da geoprópolis frente às duas bactérias estudadas. Quanto maior a concentração de geoprópolis, maior a inibição perante *C. acnes*. Em contrapartida, *S. epidermidis* demonstrou não sofrer influência da concentração de geoprópolis.

Este trabalho abre um leque de possibilidades a serem exploradas, como a avaliação da atividade antimicrobiana do extrato de geoprópolis frente a outras bactérias e com outras concentrações, alterações na concentração de extrato utilizado na formulação e, ainda, a utilização do extrato em outros veículos cosméticos. A geoprópolis é um material que possui potencial a ser explorado, visto que ainda existem poucos estudos sobre todas as suas propriedades – quando comparado com própolis de *A. mellifera* – e há a falta de legislações que definam parâmetros de identidade e qualidade específicos para esse importante produto.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, M. *et al.* *Staphylococcus aureus*. **Mostra Científica em Biomedicina**, jun. 2016.
- ALVES, H. H. S.; LUZ, M. N. C.; FRAGA, E. G. S. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de própolis vermelha frente ao *Propionibacterium acnes*. **Encontro de Extensão, Docência e Iniciação Científica**, v. 4, ed. 1, 2017.
- AVILA, S. **Determinação de parâmetros de qualidade de mel de abelhas sem ferrão utilizando ferramentas quimiométricas**. Curitiba, 2019.
- AZEVEDO, D. C. **Avaliação das propriedades antimicrobianas do mel e da geoprópolis da abelha *Plebeia aff. flavocincta* frente aos microorganismos *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis***. 2019. Artigo científico (Mestre em Sistemas Agroindustriais) - UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE, Pombal, 2019.
- BARREIRAS, D. G. *et al.* Eficácia da ação antimicrobiana do extrato de própolis de abelha jataí (*Tetragonisca angustula*) em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. **Caderno de Ciências Agrárias**, v. 12, p. 1-5, 4 jan. 2021.
- BARROS, K. B. N. T.; NETO, E. M. R.; FONTELES, M. M. F. Propolis and its Cosmetic Applications: A Technological Propection. **Journal of Young Pharmacists**, v. 11, n. 4, p. 350–352, out. 2019.
- BENTO, A. F. F. **Microrganismos Anaeróbios**. 2021. Trabalho Final (Mestrado Integrado em Medicina) - Universidade de Lisboa, Lisboa, 2021.
- BONA, E. *et al.* Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 3, p. 218–225, 2014.
- BONAMIGO, T. *et al.* Antioxidant, Cytotoxic, and Toxic Activities of Propolis from Two Native Bees in Brazil: *Scaptotrigona depilis* and *Melipona quadrifasciata anthidioides*. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2017.
- BRASIL. **Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001**. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geléia Real, Geléia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis.
- BRASIL. **Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003**. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água.
- BRESCÓ, M. S. *et al.* Pathogenic mechanisms and host interactions in *Staphylococcus epidermidis* device-related infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. AUG, 2 ago. 2017.

BROWN, M.; HORSWILL, A. *Staphylococcus epidermidis* - Skin friend or foe? **PLoS Pathogens**, v. 16, n. 11, 1 nov. 2020.

BUDOIA, M. **Estudo da composição química de extratos de geoprópolis de *Melipona quadrifasciata* (Mandaçaia) por métodos espectrofotométricos e espectrometria de massas, e avaliação de sua atividade antioxidante.** Campinas, 2019.

CARVALHO, A. *et al.* Presença de microrganismos mesófilos, psicotrópicos e coliformes em diferentes amostras de produtos avícolas. **Arquivos do Instituto Biológico**, p. 303–307, 2005.

CENTURIÃO, P. O. *et al.* Avaliação da qualidade de produtos cosméticos contendo ácido glicólico. **Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.**, v. 50, ed. 1, p. 158-173, 2021.

COLLIGNON, P. J.; MCEWEN, S. A. One health - Its Importance in Helping to Better Control Antimicrobial Resistance. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 4, n. 22, 2019.

COSTA, C. S. L. *et al.* Caracterização físico-química de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith (tiúba). **IV Jornada Científica**, Teresina, 2018.

DIAS, L. G.; PEREIRA, A. P.; ESTEVINHO, L. M. Comparative study of different Portuguese samples of propolis: Pollinic, sensorial, physicochemical, microbiological characterization and antibacterial activity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 12, p. 4246–4253, 2012.

DRÉNO, B. *et al.* *Cutibacterium acnes* (*Propionibacterium acnes*) and acne vulgaris: a brief look at the latest updates. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 32, n. 2, p. 5–14, 1 jun. 2018.

EMBRAPA. **Criação de abelhas-sem-ferrão.** Teresina, 2017.

FERNANDES, R. T.; SILVA, A. C. C.; ROSA, I. G. Características de qualidade do mel de abelha sem ferrão (*Melipona fasciculata*) produzidos na baixada maranhense. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 6, n. 6, p. 41268-41275, 27 jun. 2020.

FERREIRA, B. L. **CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA GEOPRÓPOLIS PRODUZIDA POR ABELHAS SEM FERRÃO NO ESTADO DE SANTA CATARINA.** 2018. Dissertação (Mestre em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2018.

FERREIRA, J. M. **Própolis e geoprópolis verde do semiárido do Brasil: caracterização química, origem botânica e atividade antioxidante.** 2019. Tese (Doutora em Ciência Animal) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2019.

FERREIRA, J. *et al.* Antioxidant Activity of a Geopropolis from Northeast Brazil: Chemical Characterization and Likely Botanical Origin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2017.

FRAZÃO, J. S. **Desenvolvimento de formulações cosméticas utilizando produtos apícolas e voláteis de cogumelos silvestres: determinação da estabilidade e toxicidade**. Bragança, 2017.

GEOGHEGAN, J. A.; IRVINE, A. D.; FOSTER, T. J. *Staphylococcus aureus* and Atopic Dermatitis: A Complex and Evolving Relationship. **Trends in Microbiology**, v. 26, n. 6, p. 484–497, 2018.

KÜHBACHER, A. *et al.* Central Role for Dermal Fibroblasts in Skin Model Protection against *Candida albicans*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 215, p. 1742–1752, 1 jun. 2017.

KÜHBACHER, A.; BURGER-KENTISCHER, A.; RUPP, S. Interaction of *Candida* Species with the Skin. **Microorganisms**, v. 5, n. 32, p. 32, 2017.

LAVINAS, F. C. *et al.* Brazilian stingless bee propolis and geopropolis: promising sources of biologically active compounds. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29, n. 3, p. 389–399, 2019.

LIMA, M. V. **Geoprópolis produzida por diferentes espécies de abelhas: atividades antimicrobiana e antioxidante e determinação do teor de compostos fenólicos**. Belém, 2015.

LIMA, R. **Características biológicas da geoprópolis da abelha social sem ferrão Uruçú (*Melipona scutellaris* Latreille, 1811) proveniente da Baía do Iguape-BA**. 2015. Dissertação (Mestre em Ciências Agrárias) - Universidade Federal da Paraíba, Cruz das Almas, 2015.

LOPES, A. E. **Caracterização físico-química e atividade antioxidante do mel da abelha Jataí (*Tetragonisca angustula*) proveniente de diferentes regiões do estado do Paraná**. Londrina, 2019.

LYRA, L. P. S. **Desenvolvimento de nanoemulsão de geraniol e óleo de palmarosa (*Cymbopogon martinii*) e sua ação inibitória sobre linhagens de *Cutibacterium acnes***. 2019. Dissertação (Mestre no programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada) - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”, Botucatu, 2019.

MACHADO, A.C.H.R.; SUZUKI, Y.O.F.; LEITE e SILVA, V.R. **Guia para aulas práticas: manual de inovação em cosmetologia**. São Paulo: ABC, 2020.

MATSUDA, A. H. **Caracterização e controle de qualidade de própolis proveniente de diversas regiões do Brasil**. 2006. Dissertação (Mestrado em Bromatologia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

MELLO, C.; LEITE, A. K. Avaliação do potencial anti-inflamatório e antioxidante da própolis frente à acne vulgar. **Revista Diálogos Acadêmicos**, 2020.

MEYLAN, P. *et al.* Skin Colonization by *Staphylococcus aureus* Precedes the Clinical Diagnosis of Atopic Dermatitis in Infancy. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 137, p. 2497–2504, 1 dez. 2017.

MORMINO, K. B. N. T. **Desenvolvimento e avaliação clínica de um gel facial de própolis vermelha na terapêutica da acne vulgar de grau 1 e 2**. 2020. Tese (Doutora em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2020.

OLIVEIRA, M. S. *et al.* Avaliação de três parâmetros físico-químicos de qualidade em amostras de própolis e geoprópolis de abelhas nativas sem ferrão da Amazônia. **Cadernos de Agroecologia**, Belém, v. 10, n. 3, 2015.

OSTROVSKI, K. R. **Desenvolvimento, produção e qualidade do mel de abelha Mandaçaia MQQ em ambientes urbano e rural**. Curitiba, 2019.

PAGOTTO, L. G. *et al.* Análise de variância e testes de médias: um estudo aplicado em experimentos com variedades de algodoeiro e seleções de citrumelo. **Brazilian Applied Science Review**, Curitiba, v. 5, n. 3, p. 1287-1296, jun. 2021.

POTHMANN, A. *et al.* The Microbiome and Atopic Dermatitis: A Review. **American Journal of Clinical Dermatology**, p. 749–761, 2019.

RASCHE, W. D. **Formulação e análise de gel-creme hidratante facial**. 2014. Artigo (Técnico em Química) - Centro Universitário Univates, Lajeado, 2014.

RED HOT CHILI PEPPERS, **Snow (Hey Oh)**. Los Angeles: *Warner Bros. Records*, 2006.

REIS, J. H. *et al.* Evaluation of the antioxidant profile and cytotoxic activity of red propolis extracts from different regions of northeastern Brazil obtained by conventional and ultrasound-assisted extraction. **PLoS ONE**, v. 14, n. 7, 2019.

REYNERTSON, K.; BASILE, M.; KENNELLY, E. Antioxidant Potential of Seven Myrtaceous Fruits. **Ethnobotany Research and Applications**, ed. 3, p. 025-035, 2005.

RIBEIRO, M. H. **Caracterização química e fitogeográfica de geoprópolis das espécies nativas do Maranhão**. São Luís, 2017.

ROCHA, A. *et al.* O consumo de dermocosméticos no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências da Vida**, v. 7, p. 34-37, 2019.

SANTOS, C. *et al.* Diversidade de abelhas-sem-ferrão e seu uso como recurso natural no Brasil: permissões e restrições legais consorciadas a políticas públicas. **Revista Brasileira de Meio Ambiente**, v. 9, n. 2, p. 002–022, 2021.

SANTOS, E. R. *et al.* Utilização do Extrato de Própolis como Agente Antimicrobiano em Creme Hidratante. **Revista Eletrônica Multidisciplinar FACEAR**, Curitiba, ano 4, v. 1, jan. 2015.

SANTOS, H. *et al.* Chemical profile and antioxidant, anti-inflammatory, antimutagenic and antimicrobial activities of geopropolis from the stingless bee *Melipona orbignyi*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 953, 2017.

SANTOS, L. *et al.* Chemical characterization, antioxidant, cytotoxic and antibacterial activity of propolis extracts and isolated compounds from the Brazilian stingless bees *Melipona quadrifasciata* and *Tetragonisca angustula*. **Journal of Apicultural Research**, v. 56, n. 5, p. 543–558, 2017.

SANTOS, P. A.; DE ARAÚJO, P. D. Prevalência de infecção pelo *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum* em pacientes atendidos em um laboratório de análises clínicas. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 3, p. 5507–5516, 2020.

SANTOS, P. B. R. E. **Atividade antimicrobiana de extratos de própolis sobre cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes**. 2018. Dissertação (Mestre em Biopatologia Bucal) - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”, São José dos Campos, 2018.

SANTOS, S. L. F. *et al.* Desenvolvimento de uma cartilha educativa sobre coloração de Gram em microbiologia no ensino superior. **Revista Expressão Católica**, v. 1, n. 1, 2016.

SAUNTE, D. M. L.; GAITANIS, G.; HAY, R. J. *Malassezia* - Associated Skin Diseases, the Use of Diagnostics and Treatment. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, 2020.

SCALDAFERRI, L. G. *et al.* Formas de resistência microbiana e estratégias para minimizar sua ocorrência na terapia antimicrobiana: Revisão. **Pubvet**, v. 14, n. 8, p. 1–10, ago. 2020.

SCHORRO, J. *et al.* Influência de diferentes ativos em formulações de produtos dermocosméticos com fator de proteção solar. **Brazil Journal of Development**, v. 6, ed. 5, p. 29741-29754, 2020.

SILVA, A. P. S. **Avaliação do potencial antioxidante dos extratos da folha da Goiaba-serrana (*Acca sellowiana* (O. Berg.) Burret)**. Florianópolis, 2017.

SILVA, M. C. **Avaliação da qualidade microbiológica de alimentos com a utilização de metodologias convencionais e do sistema *Simplate***. Piracicaba, 2002.

SILVA, M. *et al.* A review of the potential therapeutic and cosmetic use of propolis in topical formulations. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, p. 001–011, nov. 2019.

SILVA, W.; PAZ, J. R. Abelhas sem ferrão: muito mais do que uma importância econômica. **Natureza on line**, p. 146–152, 2012.

SIVIERI, K. *et al.* Microbioata da pele: novos desafios. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, v. 50, n. 1, p. 93–112, 2021.

SOCIEDADE BRASIEIRA DE DERMATOLOGIA. **Acne**. Rio de Janeiro, 2017.

SOUZA, T. *et al.* Avaliação da atividade anti-séptica de extrato seco de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville e de preparação cosmética contendo este extrato. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 71–75, 2007.

TORRES, A. R. *et al.* Chemical characterization, antioxidant and antimicrobial activity of propolis obtained from *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* and *Tetragonisca angustula* stingless bees. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 51, n. 6, 2018.

WILSON, D. *Candida albicans*. **Trends in Microbiology**, p. 188–189, 2018.