



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA AGROALIMENTAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SISTEMAS AGROINDUSTRIAIS
CAMPUS POMBAL – PB**

Allyson Fortunato de Abrantes

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DA APITOXINA DE *Apis mellifera*
E SUA ESTABILIDADE EM FORMULAÇÃO DE USO TÓPICO**

Pombal – PB
2015

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA AGROALIMENTAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SISTEMAS AGROINDUSTRIAIS
CAMPUS POMBAL – PB**

Allyson Fortunato de Abrantes

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DA APITOXINA DE *Apis mellifera*
E SUA ESTABILIDADE EM FORMULAÇÃO DE USO TÓPICO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Sistemas Agroindustriais da UFCG, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre.

Área de Concentração: Ciência e Tecnologia em Sistemas Agroindustriais.

Linha de Pesquisa: Produção e Tecnologia Agroindustrial.

Sob a Orientação da Professora Doutora Monica Tejo Cavalcanti.

Pombal – PB
2015

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DA APITOXINA DE *Apis mellifera* E SUA ESTABILIDADE EM FORMULAÇÃO DE USO TÓPICO

Dissertação submetida ao programa de Pós-graduação em Sistemas Agroindustriais do Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar (CCTA) -UFCG como requisito para obtenção do título de Mestre.

Data de aprovação: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof^aDr^a. Monica Tejo Cavalcanti
CCTA/UFCG
Orientadora

Prof^oDr^o. José Nilton da Silva
CCT/UFCG
Membro Externo

Prof^aDr^a. Roberlucia Araújo Candeia
CCTA/UFCG
Membro Interno

Agradecimentos

Agradeço sobretudo a Deus, essa força superior que nos conduz e nos acalenta nos momentos mais difíceis, com quem compartilho e a quem agradeço por todas as conquistas.

À Morgana Sales Abrantes e Julia Mel Sales Abrantes, por que é tudo por elas e para elas.

Aos meus pais, Maria Aldevan Abrantes e Francisco Fortunato de Sousa e ao meu Irmão Fortunato Junior, meu alicerce.

À minha orientadora, D.sc. Monica Tejo Cavalcanti, por seu comprometimento, sua sapiência e sentimento colaborativo que nos conduziu com maestria, fazendo jus ao termo professor.

À família que recebi de presente da vida, Jose Marconi Santos, Joana D`arc Sales, Josué Dantas, Mayane Sales e Ana Luisa Sales.

Aos excelentes Thayse Cavalcante e Geraildo Alexandre, “turma da eletroforese”, muito obrigado pelo companheirismo e por serem tão solícitos.

À cidade de Pombal, “Terra de Maringá”, que abriga as melhores lembranças de uma infância perfeita e que tive o prazer de redescobrir após 27 anos.

Ao meu amigo Wellington Ferreira, grande incentivador o inicio desta jornada.

Ao Apicultor Joaz Ferreira, pela colaboração, por sua dedicação Franciscana à apicultura e pelos grandes ensinamentos práticos transferidos no decorrer do trabalho.

RESUMO

O veneno da abelha, a apitoxina, consiste de uma mistura complexa de compostos nitrogenados, constando de uma maior parte proteica (Melitina) e menor fração por: Apamina, adolapina, fosfolipase A2, hialuronidase e peptídeos MCD. Trata-se de um líquido transparente, com odor característico, amargo e que apresenta pH básico (4,5 a 5,5), usado pelas abelhas como elemento de defesa e que seca facilmente em temperatura ambiente. A Melitina é o componente predominante no veneno apresentando, aproximadamente, 50 % da matéria seca, trata-se de uma proteína de elevado potencial anti-inflamatório, sendo considerada o principal agente da apitoxina na terapia da artrite reumática. Junto com a apamina, a melitina estimula os sistemas adrenal e pituitário a produzirem cortisol e outros esteroides naturais, que tem relevante papel na terapia da artrite, bem como na indústria cosmeceútica. A apitoxina foi coletada no apiário El-Shaday, Assentamento Rosário, Agrovila Canudos do município de Ceará-Mirim/RN, a coleta da amostra se deu utilizando o método de choques elétricos através de eletrodos de aço inox conectados a uma bateria e lâminas de vidro posicionado no alvado da colmeia que retêm a apitoxina após a picada da abelha. O apiário produz dois tipos de apitoxina, classificada como tipo 01, pura, e tipo 02, beneficiada. Foram realizados testes de citotoxicidade, quantificação proteica e eletroforese, em ambas as amostras, a fim de avaliá-las e comparar os dois tipos de apitoxina. Na apitoxina 01 foi realizada a concentração inibitória mínima. As amostras também foram incorporadas em duas bases dermatológicas, Gel carbopol® e Emulsão aniônica para que fossem avaliadas a estabilidade Preliminar e Acelerada das formulações. A apitoxina tipo 01, apresentou 77,83% de proteínas, uma concentração inibitória mínima a partir de 1,0% e toxicidade de 962,60 µg/mL; Os testes na apitoxina 02 apresentaram um teor proteico de 51,87% e uma citotoxicidade 154,82 µg/mL resultados possivelmente afetados pela contaminação ainda presente neste tipo de amostra após o beneficiamento. A eletroforese demonstrou que a apitoxina apresenta o mesmo perfil proteico, independente do processo de extração. Porém, a apitoxina tipo 02, aponta a diferença de uma unidade que não se revelou neste produto. As formulações mantiveram-se estáveis durante todo período de avaliação de sua estabilidade, 90 dias, onde foram avaliados pH, viscosidade, caracteres organolépticos, espalhabilidade, nas três diferentes condições de armazenamento: temperatura ambiente, 5 °C e 40 °C, exceção feita à emulsão aniônica conservada à 40 °C em que perdeu estabilidade a partir do trigésimo dia.

Palavras-chaves: Abelhas. Apitoxina. Testes de Estabilidade. Eletroforese.

ABSTRACT

The bee venom, the apitoxin, is a complex mixture of nitrogenous compounds, having largely represented by melittin protein and a smaller fraction consisting of: Apamin, adolapina, phospholipase A2, hyaluronidase and peptides MCD. It is a transparent liquid, with characteristic odour, bitter and that presents basic pH (4.5 to 5.5), used by bees as a defense and that dry easily at room temperature. The Melittin is the predominant component in poison showing approximately 50% of the dry matter, it is a high protein anti-inflammatory potential, being considered the main agent of apitoxin on rheumatic arthritis therapy. Along with the apamin, melittin stimulates the adrenal and pituitary systems to produce cortisol and other steroids, which has important role in arthritis therapy, as well as in the cosmeceutical industry. The apitoxin was collected in the Apiary El-Shaday, Settlement, Agrovila Straws of municipality of Ceara – Mirim/ RN. sample collection occurred using the method of electric shocks through electrodes of stainless steel connected to a battery and glass blades positioned at the hive entrance of the hive that retain the apitoxin after bee sting. The Apiary produces two types of apitoxin, classified as type 01, pure, and type 02 milled. Cytotoxicity tests were performed, and protein quantification in both samples in order to evaluate them and compare the two types of apitoxin, on 01 was still held the apitoxin minimum inhibitory concentration. The samples were also incorporated into two bases, carbopol Gel ® skin and anionic emulsion for primary and Accelerated stability evaluated formulations. The apitoxin type 01, 77.83% protein, introduced a minimum inhibitory concentration from 1% and toxicity of 962.60 μ g/mL; Tests on apitoxin 02 presented a protein content of 51.87% and a cytotoxicity 154.82 μ /mL results possibly affected by the contamination still present in this sample type after the processing. Electrophoresis showed that apitoxin features the same protein profile, regardless of the extraction process. However, the apitoxin 02 type, presents the difference in a unit that didn't report revealed in this product. The wording remained stable throughout assessment period of its stability, 90 days, where they were evaluated pH, viscosity, organoleptic characters, spreadability, in three different storage conditions: room temperature 5° C and 40° C, except the anionic emulsion stored at 40° C that lost stability from the 30th day.

Key words: Bees. Apitoxin, Stability, Electrophoresis Tests

“Entre as pequenas coisas que não fazemos e as grandes que não podemos fazer, o perigo está em não tentarmos nenhuma.”

Confúcio

SUMARIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	OBJETIVOS.....	13
	2.1 OBJETIVOS GERAIS	13
	2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
3.	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	14
	3.1 AS ABELHAS.....	14
	3.2 APICULTURA	19
	3.3 APITOXINA.....	20
	3.3.1 Comercio da Apitoxina no Brasil.....	25
	3.3.2 Um Breve Histórico	25
	3.4 REAÇÕES ALÉRGICAS	26
	3.5 REGULAMENTAÇÕES DA APITOXINA.....	27
	3.6 TOXICIDADE (<i>Artemia salina</i>).....	28
	3.7 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM).....	29
	3.8 ESCOLHA DO VEÍCULO FARMACÊUTICO	30
	3.9 GÉIS	32
	3.10 EMULSÕES.....	33
	3.11 ESTABILIDADE PRELIMINAR E ESTABILIDADE ACELERADA	33
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
	4.1 OBTENÇÃO DA MATÉRIA PRIMA.....	36
	4.2 CARACTERIZAÇÃO PROTEICA DA APITOXINA.....	37
	4.3 CITOTOXICIDADE FRENTE <i>ARTEMIA SALINA</i> LEACH DA APITOXINA	38
	4.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) ..	39

4.5 INCORPORAÇÃO DA APITOXINA A BASE FARMACOLÓGICA	40
4.6 TESTES DE ESTABILIDADE	41
4.6.1 Teste de Centrifugação.....	41
4.6.2 Estabilidade Preliminar	41
4.6.3 Estabilidade Acelerada	42
4.7 PARÂMETROS AVALIADOS NO ESTUDO	42
4.7.1 Características Organolépticas.....	42
4.7.2 Determinação do pH.....	42
4.7.3 Determinação da Viscosidade Aparente.....	43
4.7.4 Espalhabilidade.....	43
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
5.1 CARACTERIZAÇÃO PROTEICA DA APITOXINA.....	44
5.2 TOXICIDADE FRETE A <i>ARTEMIA SALINA</i>	49
5.3 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM).....	51
5.4 TESTES DE CENTRIFUGAÇÃO E ESTABILIDADE PRELIMINAR	52
5.5 TESTES DE ESTABILIDADE ACELERADA.....	53
5.5.1 Caracteres Organolépticos	53
5.5.2 Análise do pH	56
5.5.3 Análise da Viscosidade.....	58
5.5.4 Espalhabilidade.....	60
6. CONCLUSÕES	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	65

LISTAS DE FIGURAS

Figura 3.1 - Morfologia da Abelha	Erro! Indicador não definido.
Figura 3.2 - Imagem do aparelho produtor e excretor de veneno.....	17
Figura 3.3 - Principais estruturas e camadas da pele.....	31
Figura 3.3 – Coletor de apitoxina.....	21
Figura 4.1 - Coleta nas colmeias do apiário El-Shadai.....	36
Figura 4.2 - Beneficiamento da apitoxina tipo 01 desidratada nas placas de coleta.....	37
Figura 4.3 - Análise da citotoxicidade frente <i>Artemia salina</i> L. (A) Gaiola para realização da análise; (B) incidência direta da luz para eclosão dos náupilos .	39
Figura 5.1 - Apitoxina tipo 02 antes (A) e após (B) ao beneficiamento.....	44
Figura 5.2 - Análise eletroforética em sistema PAGE-SDS-2 β Me das proteínas presentes nos tipos 1 e 2 de apitoxina coradas em (A) Comassie e em (B) nitrato de prata	45
Figura 5.3 - Análise densitométrica da eletroforese em gel de poliacrilamida, em sistema PAGE-SDS-2 β Me das proteínas presentes nos tipos 01 e 02 e padrões	47
Figura 5.4 - Emulsão aniônica 40 °C / padrão	54
Figura 5.5 - Gel carbopol® 40 °C/padrão	55
Figura 5.6 - Gel carbopol® 5 °C/padrão	55
Figura 5.7 - Variação do pH nas formulações em Gel Carbopol 940® em função do tempo e temperatura de acondicionamento	56
Figura 5.8 - Variação do pH na Emulsão de apitoxina a 0,1% em função do tempo e temperatura de acondicionamento	58
Figura 5.9 - Variação da viscosidade dos Geis de apitoxina a 0,1% em relação ao tempo e temperatura de armazenamento	59
Figura 5.10 - Variação da viscosidade das Emulsões aniônicas de apitoxina a 0,1% em relação ao tempo e temperatura de armazenamento	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Principais componentes da apitoxina.....	23
Tabela 5.1 - Unidades polipeptídicas reveladas (kDa) nas apitoxinas tipo 01 e 02	48
Tabela 5.2 - Mortalidade e taxa de <i>Artemia salina</i> L. nas concentrações testadas para a avaliação toxicológica da apitoxina 01	49
Tabela 5.3 - Mortalidade e taxa de <i>Artemia salina</i> L. nas concentrações testadas para a avaliação toxicológica da apitoxina 02.....	49
Tabela 5.4 - Valor de DL ₅₀ calculados para apitoxina 01 e 02 com respectivos limites de confiança.....	50
Tabela 5.5 - Concentração inibitória mínima da apitoxina 01	51
Tabela 5.6 - Resultado dos testes de estabilidade preliminar.....	52
Tabela 5.7 - Resultado das características organolépticas na estabilidade.....	53
Tabela 5.8 - Variação do ph da formulação de apitoxina 0,1% em gel carbopol	56
Tabela 5.9 - Variação do pH da formulação de apitoxina 0,1% em emulsão aniônica.....	57
Tabela 5.10 - Espalhabilidade na temperatura ambiente em relação ao peso adicionado	Erro! Indicador não definido.
Tabela 5.11 - Espalhabilidade a 5°C em relação ao peso adicionado	61
Tabela 5.12 - Espalhabilidade a 40°C em relação ao peso adicionado	62

1 INTRODUÇÃO

As abelhas estão presentes no planeta há mais de 50 milhões de anos, trata-se de uma espécie que evoluiu dentro da família de insetos como vespas, formigas e cupins, e que contribui de forma impar com à preservação do meio ambiente além de oferecer ao homem diversos produtos de valor inestimável. Entre os produtos com enorme valor agregado como a geleia real, a cera, o pólen está o seu veneno: a apitoxina. Ao longo dos tempos, estes produtos vêm sendo relacionados a diversas propriedades terapêuticas e explorados por diversos segmentos industriais.

A apitoxina, que possui em sua composição peptídeos, enzimas e aminas biogênicas com alto poder alergênico e propriedades farmacológicas, demonstra forte efeito anti-inflamatório bem comopropriedades cosméticas; Sabe-se que personagens históricos como Hipócrates (460 a.C.) empregava ferroadas de abelha em seus procedimentos terapêuticos e Carlos Magno, no século VIII, foi tratado com ferroadas de abelha para combater inflamações nas juntas (MOREIRA, 2012).

Devido a estas propriedades farmacológicas, a apiterapia vem crescendo em importância, sendo observada como alternativa para uma nova forma de abordagem no tratamento da artrite reumatoide e outras patologias combatidas hoje de forma convencional através de medicamentos que possuem alto custo econômico e forte impacto colateral na saúde de seus usuários. A fim de mensurar a importância do desenvolvimento de pesquisas relacionadas à apitoxina, faz-se saber que de acordo com dados da organização mundial de saúde, a artrite reumatoide que é uma desordem autoimune de etiologia desconhecida, caracterizada por inflamações articulares sistêmicas, crônica e progressiva acomete 0,5 a 1% da população mundial, podendo chegar a 5% dependendo do grupo e da faixa etária avaliada (GPUIM, 2011).

Logo, a apitoxina apresenta-se como uma importante alternativa no combate a este tipo de patologia e na crescente indústria cosmeceutica, no entanto, são necessários estudos que promovam o desenvolvimento de

medicamentos e cosméticos seguros, eficazes, menos invasivos e que ofereça a população um custo benefício superior aos tratamentos hoje disponíveis.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar o teor proteico nos dois tipos de apitoxina coletadas no apiário El Shaday (Ceará-Mirim/RN), sua citotoxicidade frente *Artemia salina* L., e determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), assim como avaliar sua estabilidade quando incorporado a um veículo farmacêutico.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Avaliar as proteínas contidas nos diferentes beneficiamentos da apitoxina;
- ❖ Analisar a citotoxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina* L. da apitoxina;
- ❖ Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) da apitoxina frente às cepas catalogadas dos microrganismos *E. coli*, *Salmonella enteritidis* e *Salmonella typhi*;
- ❖ Incorporar a apitoxina em bases farmacêuticas de uso dermatológico.
- ❖ Avaliar a estabilidade das formulações (pH, características organolépticas, viscosidade e espalhabilidade) no período de 90 dias a temperatura ambiente, 5 °C e a 40 °C.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 AS ABELHAS

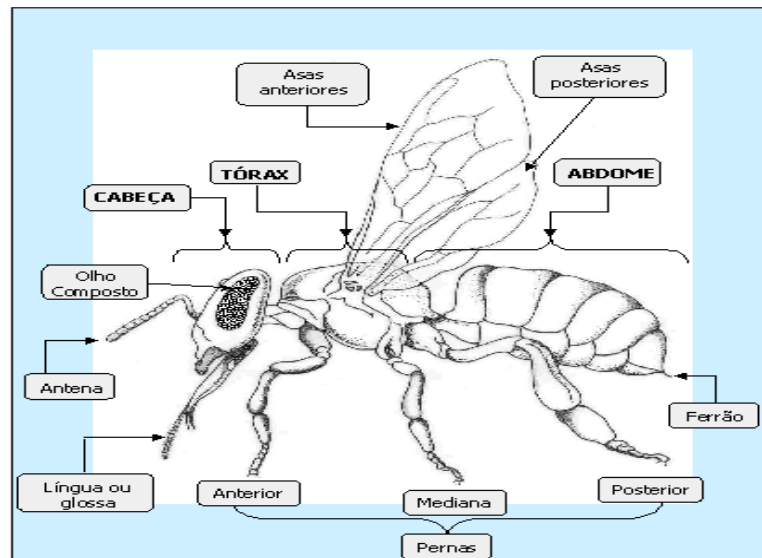
As abelhas, assim como as vespas e formigas, são insetos pertencentes à ordem Hymenoptera. Originárias de um grupo de vespas predadoras relacionadas à Superfamília *Sphecoidea* há mais de 100 milhões de anos nas regiões áridas do então supercontinente Gondwana, que foi provavelmente a área de surgimento das plantas fanerógamas (plantas produtoras de flores e frutos). Este supercontinente atualmente corresponde à África, América do Sul, Índia, Austrália e Antártica (WINSTON, 1987).

De acordo com Fonseca (1993), elas surgiram a partir de um grupo de vespas que alteraram a sua dieta alimentar deixando de utilizar insetos e ácaros na sua alimentação para fazer uso do néctar e pólen como fonte de nutrientes. Sendo assim, elas sofreram modificações na sua anatomia e fisiologia ao longo de vários anos, para se adaptarem ao novo hábito alimentar. Devido ao processo coevolutivo que estes artrópodes e as plantas experimentaram ao longo do tempo, uma relação mútua entre abelhas e plantas foi estabelecida, onde as plantas fornecem alimentos (néctar e pólen) e outros materiais essenciais a dieta destes insetos. Como recompensa as plantas recebem os serviços de polinização, importante para a subsistência de mais de 225.000 espécies vegetais, sendo que dois terços destas espécies dependem da polinização dos insetos para o seu sucesso reprodutivo.

As abelhas reúnem cerca de 20.000 espécies distribuídas praticamente por todas as partes do mundo onde há angiospermas, muitas são solitárias e relativamente pouco sociais. Os principais grupos sociais das abelhas pertencem à família *Halictidae*, *Anthophoridae* e *Apidae*, nesta última são encontradas as maiores colônias, que atingem populações com centenas e até milhares de indivíduos (PIRANI, 1993).

O corpo de uma abelha é formado por três partes: cabeça, tórax e abdômen, como podemos verificar na Figura 3.1.

Figura 3.1 - Morfologia da Abelha



FONTE: <http://projetoeckociclo.blogspot.com.br/2009/08/anatomia-da-abelha.html>

Na cabeça estão inseridos os olhos simples e compostos, antenas, aparelho bucal e algumas glândulas que são de grande importância no processo de alimentação das abelhas no estágio de cria ou de inseto adulto. Entre estas destacamos as glândulas Hipofaringeanas que tem o formato de um cacho de uvas e estão presente apenas nas abelhas operárias e são responsáveis pela produção de geleia real, substância de alto valor nutritivo que alimenta as larvas de operárias até o 3^o dia de vida e a rainha durante toda a sua vida. Ainda na cabeça encontramos as glândulas mandibulares, as quais estão presentes apenas nas operárias e na rainha. Nas operárias jovens servem para dissolver a cera e estão envolvidas na produção de geleia real, alimento destinado à alimentação das larvas.

Existem ainda dois pares de glândulas, localizados na parte posterior da cabeça – glândulas salivares – e as labiais torácicas, que estão conectadas à boca da abelha por meio de um canal salivar comum, que auxiliam na digestão dos açúcares e outros alimentos (WISTON, 1987).

O tórax é a segunda parte do corpo formada por três segmentos: protórax, mesotórax e metatórax, que estão ligados entre si por membranas e em cada um deles normalmente encontra-se inserido um par de pernas. No segundo e terceiro segmentos estão inseridas as asas, um par em cada um

deles. No terceiro par de perna (pernas posteriores) no quarto segmento (tíbia) existe uma cavidade na parte externa denominada corbícula ou cesta polínica, que serve para transportar o pólen, alimento de alto valor nutritivo para abelhas e indispensável para o bom desenvolvimento reprodutivo e produtivo das colônias (WINSTON, 1987).

O abdome é terceira parte do corpo da abelha formado por segmentos anelados, denominados urômeros, cujo número, varia de acordo com o tipo de indivíduo da colônia. Nele se encontram presentes as glândulas de cera localizadas na parte ventral, entre o quarto e sétimo segmentos abdominais das abelhas operárias. São importantes na produção de cera, principalmente nos períodos de grandes floradas, quando é exigido a construção de novos favos para a deposição de postura de rainha e de alimento – néctar e pólen. Encontramos também no abdômen a glândula de Cheiro ou de Nassanov, localizada na parte dorsal do sétimo segmento abdominal das operárias, que produz substâncias (feromônios) que são utilizadas na marcação da entrada da colmeia, fontes de água e possivelmente, de néctar e de pólen (WINSTON, 1987).

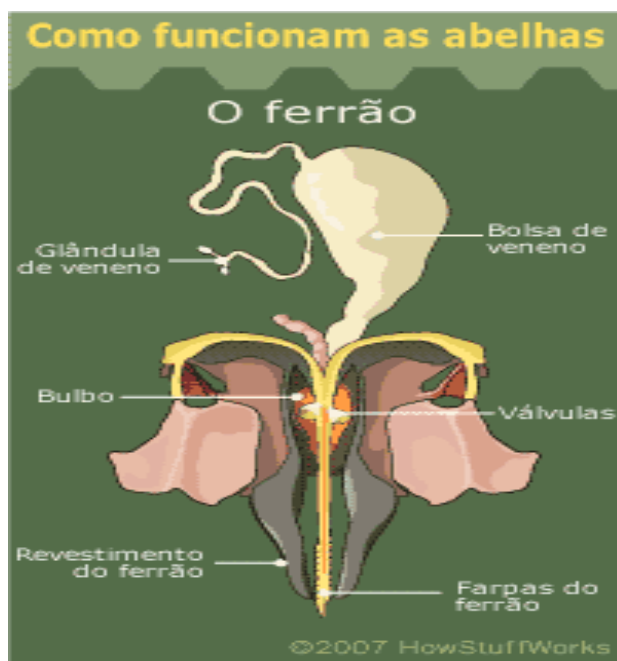
No final do abdome localiza-se o ferrão, órgão de defesa das abelhas, o qual é utilizado diante de situações de perigo iminente para excretar o veneno, que desde a sua produção até a liberação, abrange um percurso que compreende o sistema glandular, o saco de veneno, o bulbo do ferrão com sua respectiva organização muscular e o ferrão (HERNÁNDEZ, 2003).

O sistema glandular apresenta aos 14 dias a sua maior atividade enzimática (ABREU; MORAES; MATHIAS, 2010), sendo composto por uma glândula (localizada na região posterior do abdome, entre o reto e os ovários) contendo dois túbulos filiformes nos quais encontram-se várias células secretoras. Essas células apresentam grandes quantidades de retículo endoplasmático rugoso, mitocôndrias e vesículas secretoras, sugerindo assim uma intensa síntese de proteínas (ROAT; NOCELLI; LANDIM, 2006).

Um ducto comum a todas estas células, a elas conectado através de canalículos, conduz o veneno produzido até o saco de veneno, estrutura que tem como finalidade o seu armazenamento. Na seqüência, o saco do veneno se encontra com o bulbo de ferrão, que apesar de não apresentar movimento próprio, funciona como uma bomba impulsionada por uma série de músculos

que o circunda saco passa por sua estrutura fluindo até ser excretado pelo ferrão (ROAT; NOCELLI; LANDIM, 2006; HIDER, 1988), como é possível visualizar na Figura 3.2.

Figura 3.2 - Imagem do aparelho produtor e excretor de veneno



FONTE: <http://ciencia.hsw.uol.com.br/abelha1.htm>

O ferrão da abelha é uma estrutura rígida e farpada, composta por um componente dorsal fixo (estilete) e dois elementos ventrais, móveis no sentido longitudinal, (lancetas) que se encaixam mediante contração muscular e liberam o veneno, de maneira que, ao ser usado contra animais com tecido cutâneo elástico, como uma ave ou mamífero, permanece encravado no tecido mole da vítima. Quando a abelha tenta retirá-lo, o ferrão e o sétimo seguimento abdominal são cortados e deixados in situ, devido a elasticidade do tecido corpóreo da vítima e a fragilidade da musculatura abdominal que prende o aparelho de ferrão das abelhas, culminando na morte do animal por exaustão ou pela perda contínua da hemolinfa, que não apresenta agentes coagulantes capazes de impedir o seu fluxo. Assim, o último gânglio nervoso e os músculos que operam o saco do veneno são deixados com o ferrão, de modo que ele continua a injetar o veneno no corpo da vítima (WINSTON, 1994; HIDER, 1988; FREE, 1980).

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, 2000).

Entre as espécies produtoras de mel, as 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 (DÁVILA; MARCHINI, 2005) e, sobretudo, pelas novas possibilidades de usos de seus produtos na área médica. O Prof. Dr. Warwick Estevam Kerr, no intuito de aumentar a produção nacional de mel, trouxe para o Brasil por volta de 1950 a subespécie africana *Apismellifera scutellata*, visto que essas abelhas apresentavam uma alta produtividade e uma alta capacidade de adaptação. Mas, também apresentavam aspectos negativos, como a grande capacidade de enxamear e o comportamento agressivo (DÁVILA; MARCHINI, 2005).

Por esses motivos, as colmeias do apiário experimental contendo as abelhas africanas, localizado no município de Rio Claro – SP eram protegidas por uma tela, para evitar a “fuga” das rainhas e, conseqüente, dispersão da colmeia. Por um acidente, essas telas foram removidas e as abelhas se dispersaram por todo Brasil, onde, ao cruzarem com abelhas nativas e europeias que aqui se encontravam, deram origem as abelhas africanizadas. (GONÇALVES, 1974) Atualmente, acredita-se que a maioria dos ninhos naturais são compostos de formas híbridas, ou seja, abelhas africanizadas. Este híbrido passou a dominar a apicultura nacional a partir da década de 70, sendo hoje responsável pela maior parte da produção de Mel no Brasil (PIRANI, 1993).

A *Apis mellifera*, popularmente conhecida como abelha africanizada ou abelha de mel, manteve as características das africanas como a agressividade, a ocorrência de enxames várias vezes ao ano e a utilização de uma grande variedade de locais para nidificar. Esse comportamento aumenta o contato direto entre o inseto e a população, aumentando o número de acidentes (FITZGERALD; FLOOD, 2006; HERNÁNDEZ, 2003).

Abelhas da espécie *Apis mellifera*, nidificam em espaços fechados, escuros, como cavidades de rochas e árvores ocas, onde cada colônia constrói vários favos paralelos e são atraídas umas pelas outras por meio de sistemas auditivos, táteis ou químicos eficazes e formam um agrupamento dentro do seu ninho ou colmeia (FITZGERALD; FLOOD, 2006; HERNÁNDEZ, 2003). Os aspectos anatômicos desta espécie consistem em um exoesqueleto, composto pelo polissacarídeo quitina, que fornece proteção para os órgãos internos, sustentação para os músculos e proteção contra a perda de água; e estrutura corpórea dividida em cabeça, tórax e abdome (NOGUEIRA-COUTO; COUTO, 2002).

Em uma família de abelhas do gênero *Apis* são observados três tipos de indivíduos ou castas: a rainha, a operária e os zangões. Estes indivíduos apresentam diferenças morfológicas e fisiológicas que estão relacionadas com as diferentes funções que exercem na colônia. A rainha e as operárias normalmente estão presentes na colônia, já os zangões normalmente quando existe abundância de alimento no campo (PIRANI, 1993).

3.2 APICULTURA

A apicultura é conceituada por Oliveira *et al.* (2010) como a prática da criação de abelhas do gênero *Apis* para produção de mel, própolis, pólen, cera, veneno e outros produtos derivados. Em termos gerais, a apicultura possibilita a utilização permanente dos recursos naturais e atualmente apresenta um significativo retorno financeiro de baixo impacto ao meio ambiente, podendo ser desenvolvida por pequenos produtores (OLIVEIRA *et al.*, 2010; SILVA, 2010). Deste modo, representa além de produção e trabalho para esta população, aumento do fluxo de renda, satisfação pessoal para a maioria dos produtores e retorno às tradições familiares para outros, favorecendo a fixação do homem no campo (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Por apresentar baixo custo de implantação e manutenção, além de rápido retorno financeiro, a criação de abelhas *Apis mellifera* L. no Brasil é uma das atividades zootécnicas que mais tem crescido nos últimos anos no

Nordeste. Entre 1999 e 2009, a produção nordestina de mel passou de 2.795 t para 14.963 t, um crescimento de 435%.

Diante da histórica falta de oportunidades na Região Nordeste a apicultura surgiu como uma chance de sobrevivência, à medida que proporcionou a conservação e a reconstrução dos ecossistemas num contexto que poderia culminar num cenário de acelerado processo de degradação ambiental com a retirada de lenhas e queimadas como forma de subsistência, destruindo a cobertura vegetal (OLIVEIRA *et al.*, 2010; SILVA, 2010). O Nordeste brasileiro possui características de clima e flora que lhe conferem elevada competitividade no mercado mundial. O diferencial do mel Nordestino está na baixa contaminação por pesticidas, visto que o grande percentual do mel produzido na região é proveniente de vegetação nativa (VIDAL, 2013).

A apicultura Nordestina é uma atividade de caráter eminentemente familiar; atualmente, existem cerca de 46.356 apicultores em toda região e a maioria possui até 200 colmeias (VIDAL, 2013).

Nos anos em que a precipitação pluviométrica se situa em torno ou acima da média, o Nordeste responde por cerca de 40% da produção nacional de mel, porém, como a maioria das atividades agropecuárias a apicultura também está sujeita as intempéries do clima. Em 2012, com a seca que assolou a região, a florada foi insuficiente provocando elevada queda na produção em todas as áreas produtoras de mel do Nordeste brasileiro, ocorrendo também elevadas perdas de enxames por abandono da colmeia devido à alta temperatura aliada à falta de sombreamento e manejo alimentar inadequado, a Paraíba e Alagoas tiveram perda de 80% dos enxames em 2012 (VIDAL, 2013).

A queda da produção nordestina do mel repercutiu negativamente nas exportações brasileiras do produto. Em 2012 o país exportou 16,7 mil toneladas, 25% a menos que o ano anterior (VIDAL, 2013).

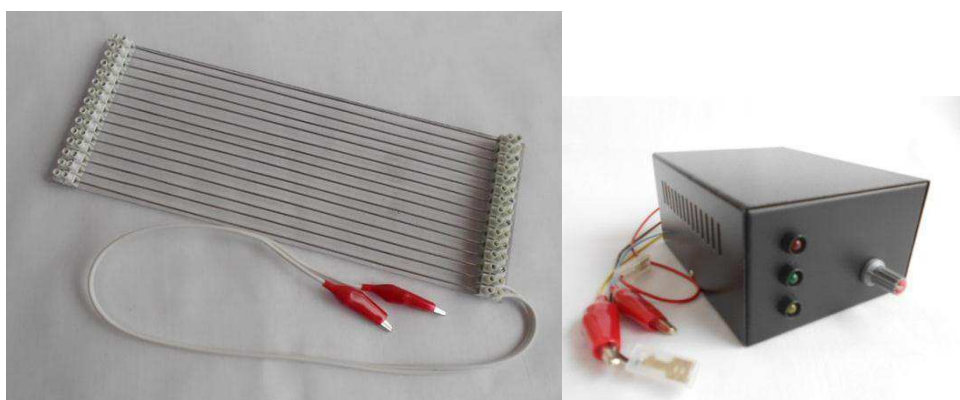
3.3 APITOXINA

Com o objetivo de proteger a colônia contra a mais variada gama de predadores, nos quais podemos destacar desde artrópodes até vertebrados, a abelha secreta o seu veneno: A apitoxina. Na espécie *Apis mellífera*, o veneno é secretado por meio de uma glândula de secreção ácida e outra de secreção alcalina, presente no interior do abdômen das abelhas operárias (FITZGERALD; FLOOD, 2006; HIDER, 1988).

Entre todos os produtos secretados pelas abelhas, provavelmente o seu veneno ou apitoxina, é o mais complexo fisiológica e quimicamente, no entanto, é também o menos representativo em termos de literatura científica (IONETE et al, 2013). Desde meados dos anos 50, o método do choque elétrico tem sido visado para estimular as abelhas a picar. O coletor normalmente é colocado na entrada da colmeia e conectado a um dispositivo que provê impulsos elétricos.

O coletor pode ser feito de madeira ou plástico que dá suporte a uma armação de arame. Debaixo dos arames está colocada uma folha de vidro que pode ser coberta com plástico ou material de borracha para evitar a contaminação do veneno, esta armação é conectada a um gerador de pulsos alimentado com bateria de 12v e 2 amperes e tem uma capacidade para gerar pulsos para dez placas.

FIGURA 3.3 – Coletor de apitoxina



FONTE: www.apariosmontanhas.com.br/apitoxina/coletorapitoxina.html

Durante a coleta, as abelhas entram em contato com a armação de arame e recebem um choque elétrico moderado. Elas picam a superfície da folha do coletor, pois identificam a excitação elétrica no momento como uma fonte de perigo. O veneno é então depositado entre o vidro e o material

protetor, onde seca e depois é raspado em laboratório para ser acondicionado em recipiente e temperatura adequada até o seu destino final (DANTAS, 2013).

A coleta do veneno gera muito estresse nas abelhas que ficam muito agressivas após esse trabalho. É aconselhável, inclusive não ter nada móvel (animais e movimentação de pessoas) a pelo menos 300 metros. A coleta deve ser feita somente 1 hora por dia e para coletar um grama de veneno é preciso extraí-lo de dez colmeias (DANTAS, 2013).

Apitoxina é caracterizada pela literatura como uma mistura complexa de compostos nitrogenados, tendo sua maior parte proteica representada pela melitina e uma menor fração composta por: Apamina, adolapina, fosfolipase A2, hialuronidase e peptídeos MCD (IONETE et al, 2013). Trata-se de um líquido transparente, com odor característico, amargo e que apresenta pH básico (4,5 a 5,5), usado pelas abelhas como elemento de defesa e que seca facilmente em temperatura ambiente. Quando em contato com olhos e mucosas causa irritação e ardência, é solúvel em água e insolúvel em álcool e sulfato de amônia. Em contato com o ar forma cristais amorfos, já o veneno seco torna-se levemente amarelado e algumas preparações para uso comercial podem apresentar-se com a cor marrom, isto graças a oxidação de algumas proteínas. A apitoxina ainda contém um elevado número de compostos voláteis os quais se perdem durante o processo de coleta, é considerada uma fonte rica de enzimas, amins biogênicas e peptídeos, com densidade 1,133 (ALI, 2012).

A maioria dos venenos dos insetos, incluindo o das abelhas, são constituídos por enzimas, proteínas, polipeptídios e uma grande variedade de outras pequenas moléculas, sendo assim, os seus efeitos farmacológicos e atividades bioquímicas convergem para uma mesma via. Induzem a dor imediata e contendo fosfolipase e hialuronidase, são capazes penetrar nos tecidos com facilidade e destruir células vermelhas (ALI, 2012).

Na Tabela 3.1, encontram-se seus principais componentes da apitoxina, veneno da *Apis mellífera*, agrupados por faixa de peso molecular.

Tabela 3.1 - Principais componentes da apitoxina

Peso Molecular	Componente	% Base seca	Observações
< 1000	Peptídeos	15	Cadeias de até 9 aminoácidos Histamina, Dopamina etc
	Monoaminas	03	
	Outros	06	
Polipeptídios 1000 a 10.000	Melitina	50	Anti-inflamatório
	Apamina	02	Anti-inflamatório
	Peptídeo MCD	02	Anti-inflamatório
	Outros	03	Tertiapina, Secapina
Enzimas > 10.000	Fosfolipase A2	12	Principal alergênico
	Hiauronidase	02	Alergênico secundário
	Outras	03	Fosf.ácida, glucosidase, esterases
Outras substâncias	Adolapina, inibidor de protease	02	

FONTE:<http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/66/apitoxina.htm>

Esta mistura complexa de substâncias químicas como peptídeos, enzimas e aminas biogênicas, apresentam atividades farmacológicas e alérgicas. Os fatores alergênicos são enzimas como fosfolipases, hialuronidases, lipases e fosfatases, proteínas antigênicas que, uma vez inoculadas durante a ferroada, iniciam respostas imunes responsáveis pela hipersensibilidade de alguns indivíduos e pelo início da reação alérgica. São agentes bloqueadores neuromusculares e possuem poderosa ação hemolítica, além de propriedades antiarrítmicas (SOUSA, 2008).

A Fosfolipase A2 é uma enzima naturalmente presente em todos os seres vivos, sendo uma das mais ativas fosfolipases conhecidas. Provoca ruptura dos fosfolipídios da membrana celular, contração do músculo liso, hipertensão e aumento da permeabilidade vascular (SOUSA 2008; MAIA, 2012). Na apitoxina existem duas estruturas bem caracterizada de fosfolipase A2, com peso molecular na ordem de 11.000 Da. Usualmente considera-se o teor médio de 12%, mas segundo alguns autores, este número pode variar de 1,8 a 27,4% p/p, sendo geralmente maiores nas abelhas africanas que nas europeias. Em

pequenas doses, a fosfolipase A2 não apresenta danos, exceto em pessoas alérgicas (MAIA, 2012).

A Hialuronidase, mesmo não sendo muito tóxica, potencia a difusão e os efeitos nocivos dos outros componentes do veneno das abelhas soltando o ácido hialurônico, responsável por conectar uma célula a outra (espaço extracelular), tornando-a assim mais permeável e conseqüentemente facilitando a entrada e atuação das demais substâncias sendo conhecida como “fator propagador”. (BECK, 1997; SOUSA, 2008; FRANÇA; MEDEIROS, 2003)

A Melitina é o componente predominante no veneno apresentando, aproximadamente, 50 % da matéria seca. (OWEN; PFAFF, 1995) Trata-se de uma proteína de elevado potencial anti-inflamatório, sendo considerada o principal agente da apitoxina na terapia da artrite reumática. Junto com a apamina, a melitina estimula os sistemas adrenal e pituitário a produzirem cortisol e outros esteroides naturais, que tem relevante papel na terapia da artrite, não possuindo as complicações médicas produzidas pelos esteroides sintéticos (MAIA, 2012). É também a toxina mais ativa no veneno das abelhas causando hemólise. Em ação com a Fosfolipase A2, compromete a integridade da membrana celular e da membrana mitocondrial, comprometendo, assim a fosforilação oxidativa e a cadeia respiratória, ocasionando dano tecidual (SOUZA, 2008).

A Melitina é um peptídeo formado por 26 aminoácidos, dos quais 10 são hidrofóbicos e seis são positivamente carregados em pH neutro, por esta razão apresenta fortes propriedades tensoativas, seu peso molecular é de 2846,5. (MAIA, 2012). A literatura imputa à melitina intensa atividade hemolítica e importante ação anti-inflamatória, antifúngica, antibacteriana e apresenta ainda ação antitumoral (ORŠOLIĆ, 2011).

A Apamina está presente em apenas 2% da matéria seca, tendo a menor neurotoxina conhecida. Age no sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP), bloqueando a transmissão de impulsos inibitórios, sua ação fisiológica está associada a modificações na noradrenalina, dopamina e serotonina e interferência nas transmissões sinápticas entre outras. Como a melitina, também estimula a função hipofisocorticorenal, acarretando aumento agudo e imediato de cortisol no sangue (SOUZA, 2008; MAIA, 2012).

O Peptídeo Degranulador de Mastócitos é responsável pela intoxicação histamínica observada nas fases iniciais do acidente e liberação de mediadores químicos. As pequenas moléculas de peptídeos como a Secapina e a Tertiapina parecem não apresentar toxicidade em mamíferos. Um provável papel desses peptídeos é repelir outros animais, como artrópodes e insetos. Na composição da apitoxina, ainda destacam-se o cardiopep (0,7%), scapina (0,5%), tertiapina (0,1%) e a melitina F (0,1%) (BECK, 1997).

3.3.1 Comercio da Apitoxina no Brasil

A apitoxina é um produto de extrema importância para a indústria farmacêutica e de grande valor no mercado internacional, no entanto, a apitoxina brasileira ainda tem uma participação restrita no mercado internacional, devido à carência de protocolos analíticos para atestar sua pureza e alergenicidade (MAIA, 2012). No Brasil o preço do grama da apitoxina varia entre R\$ 55,00 podendo atingir R\$ 59,00, no entanto diferentemente dos demais produtos apícolas, os dados da produção e comercialização brasileira ainda são incertos, carecendo este setor de uma maior fiscalização e regulação.

3.3.2 Um Breve Histórico

A primeira vez que se falou de Apiterapia, foi para fazer referência ao tratamento medicinal das picadas de abelhas, relatos mais antigos afirmam que o imperador Carlos Magno (742-814) curou um crônico quadro de gota com picadas de abelhas em doses progressivas. No século XIX algumas publicações importantes são feitas, em 1858, o professor C.W Wolf, médico Alemão, publicou o seu livro: "*Apis mellifera* ou o veneno de abelha como agente terapêutico"; Em 1868, o Dr. Philip Terc dedicou-se a investigar as causas da cura e realizou experimentos durante 10 anos, gerando críticas da comunidade científica (FELICE; PADIN; 2012).

Durante a segunda guerra mundial, o Dr. Yadoukh teve a oportunidade de aplicar esta técnica em larga escala na Rússia e foi o primeiro a comprovar de maneira empírica a eficácia da técnica, em seguida com o aprofundamento dos estudos em laboratório, sua teoria foi comprovada e a apitoxina passou a ser utilizada como terapia padronizada.

Em 1935 nos Estados Unidos foi lançado o livro “Terapia do veneno das abelhas”, do Dr. Bodog F. Beck, o que despertou um maior interesse da comunidade médica no uso da nova terapia, o Dr. R. L. Carey, discípulo do Dr. Beck, utilizou as picadas das abelhas de forma direta em seus pacientes, afirmando que eram mais eficazes que os concentrados do veneno vendidos em ampolas nas farmácias. A técnica tornou-se popular e difundiu-se no mundo, França, México, China, vários são os relatos do uso da apitoxina para diversos tipos de enfermidades (FELICE; PADIN; 2012).

A partir do século XX, principalmente após 1945, começam os estudos controlados com o objetivo de investigar as propriedades terapêuticas da apitoxina para dar sustentação científica ao que antes era baseado apenas no empirismo, visando a uma melhor compreensão dos seus efeitos e a um uso mais seguro e eficaz. Em 2012, o professor MahmoudAbduAl- Samie Mohamed Ali da Universidade de Agricultura do Cairo, publicou um artigo com os principais usos medicinais do veneno da abelha, no qual trata também sobre sua composição, possíveis reações alérgicas e formas de utilização. No artigo o professor Ali demonstra a eficácia da apiterapia no tratamento de doenças inflamatórias como bursite, artrites, tendinites e outras patologias como a osteoartrite, esclerose múltipla e Herpes zoster (ALI, 2012).

No Brasil, estudo desenvolvido na Universidade Federal de Minas Gerais culminou no pleito da patente de composições farmacêuticas contendo frações isoladas de apitoxina de baixa alergenicidade para o tratamento de pacientes acometidos de artrite reumatoide e outras condições inflamatórias dolorosas.

3.4 REAÇÕES ALÉRGICAS

Picadas de abelhas em pessoas alérgicas particularmente são danosas e perigosas, de acordo com diferentes estudos, de 1 a 5% das pessoas mundo

afora são alérgicas a picadas de abelha e demais insetos(SASVARY; MUELLER, 1994).

Existem dois tipos de reação alérgica a picadas de abelha: Uma reação forte e localizada e uma reação generalizada.No primeiro caso, o local da picada torna-se avermelhado e dolorido, podendo persistir durante um longo período do dia, já na reação generalizada, os primeiros sintomas começam a surgir poucos minutos após receber a picada, podendo ser acompanhados de náuseas, calafrios e vomito. Os principais sintomas vermelhidão, inchaço, principalmente na face, e coceira. No pior dos casos a vitima pode apresentar problemas circulatórios e choque anafilático (SASVARY; MUELLER, 1994).

Geralmente, o primeiro sintoma é coceira nas palmas das mãos, aproximadamente dois minutos após a picadura e nos próximos minutos a sensação de coceira se esparrama por todo o corpo, chegando à face (SIMICS, 2000). O pescoço e a face começam a inchar, a pulsação aumenta a frequência e a pessoa sua bastante e ocorre vertigem. O estado mental confuso que às vezes ocorre é devido à falta de sangue (oxigênio) no cérebro. A glote pode fechar (asfixiando-se) culminando em choque anafilático. (TILL *et al*; 2004) Essa falta de oxigênio pode levar à morte cerebral ou de outros tecidos, como necrose do miocárdio. (FERREIRA, 1995) É muito importante remover o ferrão assim que possível. É melhor removê-lo com um par de pinças, mas se isto não é possível, deve-se retirá-lo raspando com a unha ou faca. Nunca se deve apertar o saco de veneno do ferrão, porque o veneno entrará mais ainda na ferida. Se for possível, deve ministrar um anti-histamínico ou produto à base de cortisona (LEITE; ROCHA; 2005).

3.5 REGULAMENTAÇÕES DA APITOXINA

Para fixação de identidade e qualidade de apitoxina, foi aprovado pelo secretário de defesa agropecuária e publicado na DOU de 23/01/01 a Instrução Normativa: Regulamentos Técnicos e identidade e qualidade da Apitoxina que estabelece o seguinte, Portaria nº 001/81-07/10/1981 do Ministério da Agricultura e do Abastecimento.

Procurou estabelecer a identidade e os requisitos mínimos de qualidade que deve atender à apitoxina, destinada ao comércio nacional ou internacional, a ser utilizada como matéria-prima para finsopoterápicos (terapias desenvolvidas a partir de sucos ou extratos oriundos de glândulas ou órgãos de animais). Logo, a apitoxina foi definida como sendo o produto de secreção das glândulas abdominais das abelhas operárias e armazenado no interior da bolsa de veneno.

Classificação da apitoxina de acordo com apresentação do produto em apitoxina na forma de pó amorfo ou apitoxina na forma cristalizada, tendo a sua designação de venda: Apitoxina, Tendo por composição: água e substâncias ativas, como a apamina, melitina, fosfolipase, hialuronidase e aminoácidos, características sensoriais próprias ao produto.

Segundo a regulamentação, o acondicionamento do produto deverá ser feito com materiais adequados para as condições de armazenamento e que lhe confirmam proteção apropriada contra contaminação bem como preencher requisitos físico-químico como umidade máxima 3%, teor proteico 50 a 85%, fosfolipase A 17 a 19 U/mg proteína, o produto deverá ser acondicionado com materiais adequados para as condições de armazenamento e que lhe confirmam uma proteção apropriada contra a contaminação, não se autoriza a utilização de aditivo.

As quantidades de contaminantes orgânicos e inorgânicos não devem estar em quantidades superiores aos limites estabelecidos pelo Regulamento específico vigente e as práticas de higiene para a elaboração do produto devem estar de acordo com o Regulamento Técnico sobre as Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Elaboradores industrializadores de Alimentos-Portaria nº 368, de 04/09/97-MA,o produto não deverá conter matérias estranhas de qualquer natureza.

3.6 TOXICIDADE (*Artemia salina*)

De acordo com PARRA *et al.* (2001), devido ao custo elevado e ao sofrimento causado há uma tendência natural de substituição do uso de animais em laboratórios, os métodos alternativos incluem testes de

citotoxicidade, como o que utiliza a *Artemia salina*. Trata-se de um microcrustáceo da classe *Anostracea*, que vive em águas salinas salobras de todo o mundo. Possui quatro estágios de desenvolvimento: ovo, náuplio, metanauplio e adulto (NUNES *et al.*, 2006).

O ensaio de citotoxicidade com o microcrustáceo apresenta baixo custo, confiabilidade e praticidade para determinar a bioatividade de compostos sintéticos ou produtos naturais. Em 1982 Meyer e colaboradores estabeleceram uma correlação entre o grau de toxicidade e a concentração letal média (CL₅₀), apresentada por extratos de plantas sobre larvas de *Artemia salina*, considerando valores acima de 250 µg/ml são considerados com baixa toxicidade, entre 80 e 250 µg/ml toxicidade moderada e abaixo de 80 µg/ml tóxicos (DOLABELA, 1997).

Esse ensaio serve como biomonitoramento de produtos naturais, sendo considerado um método rápido, confiável e de baixo custo, empregado para a determinação de citotoxicidade (SIQUEIRA *et al.*, 1998). É importante acrescentar que diversos trabalhos tentam correlacionar a toxicidade destas espécies com outras atividades biológicas, como antimicrobiana, parasiticida, antiviral e antitumoral (SAHPAZ *et al.*; 1994). A toxicidade frente *Artemia salina* não pode ser diretamente extrapolada para humanos já que o homem apresenta meios fisiológicos para eliminar substâncias tóxicas (OKOLI; IROEGBU, 2004).

3.7 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

A atividade antimicrobiana de um ativo é avaliada através da determinação da menor quantidade necessária desta substância para inibir o crescimento do microrganismo-teste; esse valor é conhecido como Concentração Inibitória Mínima. O constante surgimento de microrganismos resistentes e infecções oportunistas transformaram as pesquisas por novos agentes antimicrobianos no campo farmacêutico e cosmético (OSTROSKY *etal.*; 2008).

Existem vários métodos para mensurar a Concentração Inibitória Mínima, entre os quais podemos destacar: O teste de difusão em ágar, também

chamado de difusão em placas, é um método físico, no qual um microrganismo é desafiado contra uma substância biologicamente ativa em meio de cultura sólido e relaciona o tamanho da zona de inibição de crescimento do microrganismo desafiado com a concentração da substância ensaiada (Pinto *et al.*, 2003),(OSTROSKY*etal*; 2008); Teste de difusão em disco, que é aceito pelo FDA (Food and Drug Administration), o qual consiste na aplicação de uma alíquota do agente antimicrobiano em teste em um papel filtro de 6 mm de diâmetro nas diferentes concentrações a serem testadas; há ainda técnicas menos utilizadas como o uso de Cilindros em aço inoxidável e a perfuração em Agar(OSTROSKY*etal*; 2008). Entre os mais utilizados encontram-se ainda o método da diluição em caldo que considera a relação entre a proporção de crescimento do microrganismo desafiado no meio líquido e a concentração da substância ensaiada, onde pode ser empregada a metodologia da macrodiluição e microdiluição (OSTROSKY*etal*; 2008).

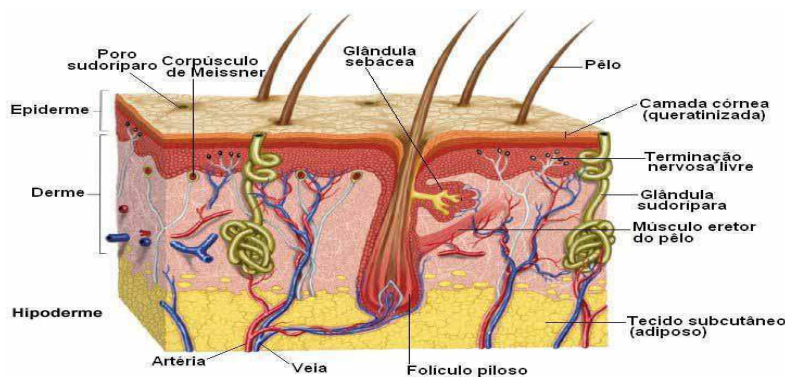
Em 2015, LEANDRO realizou um estudo, utilizando-se do método da macrodiluição em ágar, a fim de avaliar a atividade antimicrobiana da apitoxina in natura e de seus componentes de forma isolada e obtiveram resultados significativos com microrganismos contaminantes da cavidade oral, numa concentração de 0,2%.

3.8 ESCOLHA DO VEÍCULO FARMACÊUTICO

A pele é um órgão extenso que recobre todo exterior do corpo, variando sua estrutura de acordo com a sua função específica, entre as quais incluem a proteção contra agentes externos, sensação (frio, calor, dor, pressão), termo regulação, secreção de lipídeos entre outras (CHORILLI; 2007) O padrão histológico da pele pode ser definido a partir das três camadas que a compõem: epiderme, derme e hipoderme.

A epiderme é um epitélio de revestimento e encontra-se firmemente acoplada ao tecido conjuntivo subjacente do qual recebe suporte, a derme. Abaixo da derme reside um tecido conjuntivo frouxo, a hipoderme, que contém gordura (BARBOSA; 2011).

Figura 3.3 - Principais estruturas e camadas da pele



FONTE: <http://hdl.handle.net/10284/1606>

A absorção de fármacos na pele é afetada por vários fatores como: Espessura, temperatura, grau de hidratação, concentração, fluxo sanguíneo, limpeza da pele, integralidade do princípio córneo, raça, pH na superfície da pele, número de folículos pilosos. (WOKOVICH *et al* 2006; SILVA, 2010)

Alguns autores como Ansel, Popovich e Allen (2000) e Simonsen, Petersen e Groth (2002), elencam ainda alguns outros fatores de importância no mecanismo de absorção de fármacos pela pele, entre eles podemos citar:

A concentração do fármaco, a quantidade de fármaco que permeia a pele por unidade de superfície de área por intervalo de tempo aumenta medida que a concentração do fármaco no veículo também aumenta; O tempo e intensidade de massagem, o tempo e a intensidade do massageamento ou fricção na aplicação tópica tem relação direta com a quantidade de fármaco absorvida, logo, quanto maior o período e a intensidade de fricção, maior a absorção; Local de aplicação, a permeabilidade cutânea parece ser maior quando o medicamento é aplicado a pele que possui uma camada córnea fina; Área de aplicação, quanto maior for a área de aplicação maior será a quantidade de fármaco absorvida pela via cutânea.

A indústria farmacêutica em conjunto com instituições públicas e privadas em todo o mundo realizam pesquisas com o intuito de possibilitar condutas terapêuticas eficientes, com resultados clínicos rápidos e seguros. BRANDAN, (2009); SILVA, (2010). O desenvolvimento de formulações transdérmicas é uma estratégia interessante para o transporte de diversas

classes de fármacos, tanto hidrofílicos quanto lipofílicos, representando uma alternativa para superar aspectos relacionados às características farmacocinéticas e farmacodinâmicas de diversos medicamentos quando utilizados por outras vias. TEICHMANN, (2007); SILVA,(2009).

Através da utilização da via transdérmica algumas vantagens farmacocinéticas são auferidas em relação a outras vias de administração. Evita-se o metabolismo de primeira passagem hepática, comum para fármacos administrados pela via oral, o qual é o responsável por diminuir a biodisponibilidade e degradar diversos fármacos. No tocante ao uso da apitoxina como anti-inflamatório na substituição da terapia com uso de medicamentos anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) administrados por via oral, podem-se evitar efeitos secundários, como náuseas, dispepsia, diarreia, constipação, ulceração e sangramento na mucosa. SILVA *et al.* (2010), trazendo ganhos enormes para a saúde do usuário, além de possuir fácil administração, ser indolor e não invasiva, aumentando a adesão do paciente à terapia SWART (2005); BADRAN (2009).

A estabilidade é um parâmetro de validação pouco descrito em normas de validação de metodologia analítica (VILEGAS & CARDOSO, 2007), mas necessário para assegurar a qualidade de um produto, desde a fabricação até a expiração do prazo de validade. Variáveis relacionadas à formulação, ao processo de fabricação, ao material de acondicionamento e às condições ambientais e de transporte, assim como cada componente da formulação seja ativo ou não, podem influenciar na estabilidade do produto (ISAC *et al.*, 2009).

3.9 GÉIS

Os géis são sistemas semissólidos que consistem em dispersões de pequenas ou grandes moléculas em veículo líquido que adquire consistência semelhante a geleias pela adição de um agente gelificante (ANSEL; POPOVICH; ALLEN 2000), pode-se ainda conceituá-los, como preparações semi-sólidas compostas de partículas coloidais que não se sedimentam, ficando dispersas.

Geralmente, as substâncias formadoras de géis são polímeros que quando dispersos em meio aquoso assumem conformação doadora de viscosidade à preparação. Polímeros são basicamente substâncias de alto peso molecular, também conhecidas como macromoléculas, provenientes do encadeamento de moléculas menores (CORREA, 2005).

De acordo com as características do polímero, os géis podem apresentar natureza não iônica ou iônica, os de natureza não iônica possuem estabilidade em ampla faixa de pH, tornando-se possível a veiculação de substâncias de caráter ácido, já os de caráter iônico são pH dependentes, ou seja, apresentam-se estáveis em pH neutro ou próximo de neutro (CORREA, 2005).

Os géis hidrofílicos têm sido muito utilizados como base dermatológica, pois apresenta fácil espalhamento, não são gordurosos e podem veicular princípios ativos hidrossolúveis e lipossomas, sendo mais indicados para pessoas que possuem pele oleosa e mista (CORREA, 2005).

3.10 EMULSÕES

Emulsões são preparações farmacêuticas de aspecto leitoso com características de um sistema disperso de duas fases líquidas. Trata-se de um sistema de pelo menos duas fases imiscíveis ou praticamente imiscíveis. De acordo com a hidrofilia ou lipofilia da fase dispersante, estes sistemas classificam-se em óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O) um disperso no outro na forma de gotículas microscópicas, representando uma fase orgânica apolar, e outra polar, respectivamente (CALDERON; SCHIMITT; BIBETT 2007).

Farmacotecnicamente, a Emulsão deverá ser não irritante, não se degradar e ser compatível com princípios ativos e aditivos especiais; ou seja, o produto farmacêutico deverá ter estabilidade (CARMINI; JORGE, 1989).

3.11 ESTABILIDADE PRELIMINAR E ESTABILIDADE ACELERADA

Estabilidade de um fármaco é conceituada como o tempo durante o qual o fármaco mantém sua integridade em termos de qualidade, quantidade e identidade química (LACHMAN; DELUCCA, AKERS; 2001).

O estudo de estabilidade é de vital importância para padronização de produtos fitoterápicos, pois uma perda de estabilidade acarretaria alterações em três requisitos essenciais para o funcionamento de um fármaco: qualidade, eficácia e segurança. A estabilidade mostra o tempo pelo qual o fármaco retém sua integridade e pode ser afetada por fatores como temperatura, pH, luminosidade e ar (FERREIRA; SOUTO; 2007).

Os testes de estabilidade devem contemplar as zonas climáticas onde o produto está sendo comercializado, o Brasil situado na zona climática IV onde as condições de temperatura e umidade relativa estabelecidas são de $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $75\% \pm 5\%$ em estudo acelerado de seis meses (RECHIA, 2010; WHO, 1996, BRASIL, 2005).

A Estabilidade Preliminar, também conhecido como teste de triagem ou de curto prazo, tem como objetivo auxiliar e orientar a escolha das formulações. Este estudo consiste em submeter às amostras a condições extremas de temperatura e realizar os ensaios em relação aos vários parâmetros de acordo com a forma farmacêutica utilizada, é um teste realizado na fase inicial do desenvolvimento do produto, utilizando-se diferentes formulações de laboratório e com duração reduzida. Emprega condições extremas de temperatura com o objetivo de acelerar possíveis reações entre seus componentes e o surgimento de sinais que devem ser observados e analisados conforme as características específicas de cada tipo de produto (BRASIL, 2004).

Após a avaliação da estabilidade preliminar, as formulações serão submetidas ao teste de Estabilidade Acelerada, também conhecida como Estabilidade Normal ou Exploratória que tem como objetivo fornecer dados para prever a estabilidade do produto, tempo de vida útil e compatibilidade da formulação com o material de acondicionamento (BRASIL, 2004).

Este teste emprega geralmente condições menos extremas que o teste anterior, Serve como auxiliar para a determinação da estabilidade da formulação. É um estudo preditivo que pode ser empregado para estimar o prazo de validade do produto, Podendo ainda ser realizado quando houver

mudanças significativas em ingredientes do produto e ou do processo de fabricação, em material de acondicionamento que entra em contato com o produto, ou para validar novos equipamentos ou fabricação por terceiros(BRASIL, 2004). Durante ambos os testes serão avaliados parâmetros físico-químicos como: Espalhabilidade, pH, Viscosidade e caracteres organolépticos.

4.MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DA MATÉRIA PRIMA

A apitoxina utilizada neste trabalho foi coletada no apiário El-Shaday, Assentamento Rosário, Agrovila Canudos do município de Ceará Mirim-RN, sob responsabilidade do apicultor Joaz Ferreira da Silva. Para a coleta da amostra adotou-se o método de choques elétricos através de eletrodos de aço inox conectados a uma bateria e lâminas de vidro posicionado no alvado da colmeia, que retêm a apitoxina após a picada da abelha. Esta técnica é utilizada desde meados dos anos 50, em virtude de permitir a extração do veneno, preservando a vida da abelha, o intervalo entre as coletas no apiário é de oito dias (GRAMACHO; MALASPINA; PALMA 1992).

Para a obtenção da apitoxina, os coletores foram posicionados na entrada de cada colmeia e conectados a parte elétrica de um equipamento portátil desenvolvido pelo apicultor. Ao entrar na colmeia, a abelha pousa sobre a placa de vidro e recebem um impulso elétrico, e na tentativa de se defender reagem ferroando a placa de vidro, e nela depositam o veneno. A coleta da apitoxina no apiário em estudo segue ilustrada na Figura 4.1.

Figura 4.1 - Coleta nas colmeias do apiário El-Shadai



Fonte: Autoria própria

Após o processo de coleta da apitoxina no apiário em estudo, se faz necessário um beneficiamento do produto para sua posterior comercialização.

Assim, a apitoxina coletada é classificada, em dois tipos distintos de acordo com o seu beneficiamento, em apitoxina tipo 01 referida ao material retirado das placas de vidro raspadas com lâminas após sua desidratação natural pronta para ser comercializada (Figura 4.2) e apitoxina tipo 02 retirada do acúmulo nas valetas coletoras a qual necessita ser beneficiada por meio de lavagem com água destilada na proporção de 3 mL de água a cada grama de apitoxina utilizada. A solução resultante é então filtrada em papel de filtro qualitativo e desidratada em temperatura ambiente (aproximadamente 30 °C).

Figura 4.2 - Beneficiamento da apitoxina tipo 01 desidratada nas placas de coleta



Fonte: Autoria própria

O material foi coletado no apiário e transportado em caixas isotérmicas ao Laboratório de Tecnologia de Origem Animal e demais Laboratórios do Centro de Ciências e Tecnologia Agroindustrial da Universidade Federal de Campina Grande, campus Pombal- PB, para realização das análises específicas.

4.2 CARACTERIZAÇÃO PROTEICA DA APITOXINA

A principal hipótese deste estudo foi identificar se a apitoxina beneficiada, denominada tipo 02, possui a mesma quantidade de proteínas que a apitoxina denominada de tipo 01. Para isto o teor de nitrogênio total foi

determinado pelo método de Micro-Kjeldahl, utilizando-se o fator 6,25 para transformação do nitrogênio total em proteínas conforme recomendado pela AOAC (1992).

As amostras de apitoxina (tipo 01 e 02) foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida, sistema PAGE-SDS-2 β Me, realizado conforme metodologia descrita por Laemmli (1970) adaptado para o uso de géis de separação em placas (10 x 10 x 0,1 cm) (marca Kasvi).

O gel de aplicação contendo 6% de poliacrilamida foi montado em tampão Tris-HCl 0,6 M, pH 6,8 e SDS a 1,0% (p/v). O gel de separação, com gradiente de 15% de poliacrilamida, foi montado em tampão Tris-HCl 3,7 M, pH 8,9 contendo SDS a 1,0%. A corrida eletroforética foi realizada à voltagem constante de 200 V. Após a eletroforese, o gel foi corado durante 12 horas com Coomassie Blue Brilliant R-250 a 0,05% preparado em metanol, ácido acético e água (1:3,5:8, v/v/v) com descoramento do gel e visualização das unidades proteicas com metanol, ácido acético e água (1:3,5:8, v/v/v).

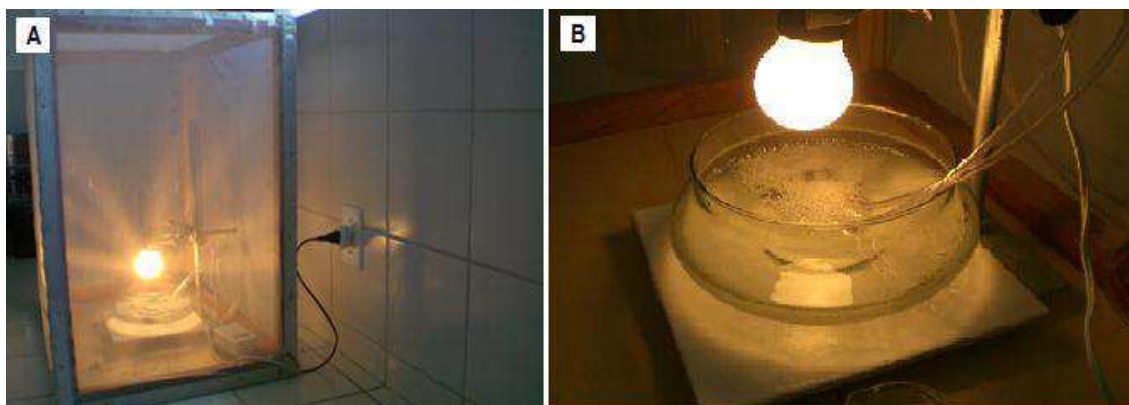
O gel corado foi fotografado em scanner e a imagem obtida processada através do software Image J (IMAGEJ, 2015). O resultado expresso em gráfico com picos em série, sendo cada pico correspondente a uma subunidade proteica separada. O número de gráficos dispostos no espaço cartesiano dos eixos X (distância percorrida) e Y (densidade ótica) corresponderam ao número de produtos aplicados no gel. A distância de cada pico nas amostras foi usada para obter o peso molecular a partir da calibração com padrões de pesos moleculares 26,6, 17, 14,2, 6,5, 3,49 e 1,06 kDa (M 3546, SIGMA – Molecular Weight Marker, Ultra Low Range for SDS-PAGE) e a área referente aos picos foi usada para obter o conteúdo relativo de cada subunidade proteica na mistura de proteínas revelada no gel.

4.3 CITOTOXICIDADE FRENTE *ARTEMIA SALINA* LEACH DA APITOXINA

O bioensaio frente *Artemia salina* L. foi baseado na técnica descrita por Meyer et al. (1982), utilizando como solução salina uma mistura de água do mar e água destilada (1:1), onde os ovos do microcrustáceo (0,2 g) foram incubados de 24 a 48 horas em gaiola construída com tela para impedir a

entrada de insetos, aeração e incidência direta de luz como apresentado na Figura 4.3.

Figura 4.3 - Análise da citotoxicidade frente *Artemia salina* L. (A) Gaiola para realização da análise; (B) incidência direta da luz para eclosão dos náupilos



Fonte: Laboratório de Tecnologia de Grãos e Cereais (CCTA/UFCG)

Após a eclosão, 10 náuplios foram transferidas para tubos de ensaio contendo 5,0 ml de água salina a 3,5%, obtida através da mistura (1:1) entre água do mar e água destilada, com diferentes concentrações da apitoxina tipo 01 e 02. As amostras foram submetidas à iluminação artificial durante 24 horas, após este período foram contabilizadas as larvas vivas e mortas. O experimento foi realizado em triplicata para cada concentração estudada (2500, 1250, 250, 150, 62,5, 31,2 e 0 µg/mL). Para obtenção dos valores da dose letal para 50% da população de larvas (DL_{50}) foi utilizada a análise PROBIT (FINNEY, 1962), através do software BioStat[®] 2009, com 95% de confiança.

O critério de classificação frente *Artemia salina* Leach com base nos valores encontrados na DL_{50} foi definido por Dolabella (1997), sendo estabelecido como $DL_{50} \leq 80$ µg/mL, produto altamente tóxico; DL_{50} entre 80 a 250 µg/mL, produto moderadamente tóxico; e $DL_{50} \geq 250$ µg/mL, produto levemente tóxico ou atóxico.

4.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

As cepas teste utilizadas foram de *Salmonella thyphimurium* (ATCC-14028), *E. coli* (ATCC-8739) e *Salmonella enteritidis* (ATCC-1307G) as quais foram doadas pela Fiocruz (Rio de Janeiro – RJ).

A determinação da CIM foi realizada apenas na amostra da apitoxina tipo 01, utilizada para comercialização pelo apiário em estudo por meio da técnica de macrodiluição em caldo nutriente acrescidos de 0,15% de ágar bacteriológico, suplementadas com concentrações crescentes de apitoxina, sendo posteriormente adicionado 1mL do inóculo da cepa teste. O sistema foi incubado de 35 a 37 °C por 24 horas. Ao término do período de incubação a mais baixa concentração (mais alta diluição) que não apresentou crescimento microbiano visível (turvação) foi considerada como a concentração inibitória mínima (NCCLS, 1997).

4.5 INCORPORAÇÃO DA APITOXINA A BASE FARMACOLÓGICA

A apitoxina tipo 01, utilizada para comercialização, foi incorporada em duas bases farmacêuticas, um Gel Carbopol 940® e uma Emulsão Aniônica, manipulados no Laboratório de semissólidos da empresa Medicamentos Associados LTDA no município de Sousa-PB.

As emulsões aniônicas foram preparadas a partir dos componentes da fase oleosa (Lanette N 20%, Cetiol V 10%) e da fase aquosa (Sorbitol 10%, Phenonip 0,5%, EDTA dissódico 0,2%, BHT 0,05%, Água destilada q.s.p. 100g de produto) onde foram fundindo a 75 °C, em banho Maria, a fase O (oleosa) e a fase A (aquosa) separadamente com agitação manual constante. Após o tempo necessário para as duas fases atingirem a mesma temperatura, a fase aquosa foi vertida sob a fase oleosa e manteve-se agitação em banho-maria por mais 10 minutos para retirada do produto e seu posterior resfriamento. A emulsão formada foi deixada em repouso por 24 horas, em temperatura ambiente.

O gel carbopol 940® foi manipulado solubilizando-se os componentes (Metilparabeno 0,2%, propilparabeno 0,2%, EDTA 0,1%, Glucam E 20®, Carbopol 940® 2,0%, Germal 115® 0,1%, Água destilada q.s.p 100g de produto) em água destilada no banho-maria a 70 °C até sua incorporação sob agitação em velocidade moderada até a completa dispersão. Na sequência, a temperatura foi reduzida a 40 °C e adicionado o Germall® (conservante) com posterior ajuste do pH para 6,5 com trietanolamina.

A apitoxina foi solubilizada em água destilada e incorporada na concentração de 0,1% em ambas as formulações e acondicionadas durante o processo em embalagens plásticas em polipropileno previamente higienizadas, a fim de que a sua estabilidade seja avaliada segundo protocolos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (BRASIL, 2004). O material empregado nos ensaios foi manipulado em um único lote, usando os mesmos insumos, para rechaçar a possibilidade de interferência na estabilidade das formulações devido a possíveis diferenças entre os insumos utilizados.

4.6 TESTES DE ESTABILIDADE

4.6.1 Teste de Centrifugação

As formulações de apitoxina a 0,1% em gel carbopol 940 e emulsão aniônica foram submetidas preliminarmente a centrifugação na velocidade de 1.169 g (3.000 RPM) durante 30 minutos, utilizando a centrífuga modelo ct 5.500d (marca Cientec), com o objetivo de verificar uma possível instabilidade inicial (BRASIL, 2004).

4.6.2 Estabilidade Preliminar

As formulações em teste foram submetidas a condições de estresse visando acelerar o surgimento de possíveis sinais de instabilidade, as amostras foram expostas a aquecimento em estufa a 40°C (\pm 2°C) e resfriamento em refrigeradora 5°C (\pm 2°C) em seis ciclos alternados gelo-degelo durante 12 dias, onde foram avaliados parâmetros organolépticos de aspecto, cor e odor, bem como parâmetros físico-químicos como o pH e a viscosidade, ambos no início e final do experimento, os quais foram ser apresentados como média aritmética dos valores obtidos dos testes realizados em triplicata (BRASIL, 2004).

4.6.3 Estabilidade Acelerada

Os testes foram realizados durante 90 dias, em alguns casos, a duração deste teste pode ser estendida por seis meses ou até um ano, dependendo do tipo de produto. As amostras de gel e emulsão do mesmo lote foram fracionadas em três embalagens acondicionadas simultaneamente em estufa a 40°C ($\pm 2^\circ\text{C}$), refrigerador a 5°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) e temperatura ambiente ($\pm 25^\circ\text{C}$) com exposição à radiação luminosa. Durante o experimento, as análises foram realizadas inicialmente no tempo 1 (24h), e no 15°, 30° e 60° e 90° dias, onde foram avaliados os caracteres organolépticos de aspecto, cor e odor os parâmetros físico-químicos de pH, viscosidade e espalhabilidade. Foram mantidas amostras padrão em temperatura ambiente e ao abrigo da luz para efeitos comparativos (BRASIL, 2004).

4.7 PARÂMETROS AVALIADOS NO ESTUDO

4.7.1 Características Organolépticas

A avaliação da cor, aspecto e odor, constituem o método mais simples para verificar a qualidade e guardam relação com a qualidade e integridade dos produtos. Adicionou-se uma alíquota de cada amostra em vidro de relógio, analisando-as sobre fundo branco em comparação aos padrões (base sem a incorporação da apitoxina). O aspecto e a cor foram avaliados visualmente e o odor através do olfato (BRASIL, 2004).

4.7.2 Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada através da utilização do pHmetro de bancada digital da marca Gehaka, modelo PG 2000, calibrado com as soluções padrões do próprio fabricante. O eletrodo foi introduzido diretamente na

amostra a temperatura ambiente de (25°C) para verificação do potencial hidrogenionico da formulação. Este teste foi realizado em triplicata para cada amostra no seu respectivo tempo de armazenamento.

4.7.3 Determinação da Viscosidade Aparente

A determinação da viscosidade foi realizada através da utilização do viscosímetro rotacional BROOKFIELD modelo LVT, no qual a amostra é medida por velocidade de rotação de eixos metálicos (spidle) inseridos na amostra. Aproximadamente 250g de cada formulação foram acondicionadas em embalagens plásticas para leitura da viscosidade. Utilizou-se o spidle LV4 e este foi inserido na amostra a uma rotação de 0,3 rpm durante 3 minutos.

4.7.4 Espalhabilidade

Para a avaliação da espalhabilidade utilizou-se um aparato composto por uma placa suporte de vidro sob uma folha de papel milimetrado e uma placa molde circular de vidro com 20 cm de diâmetro, 0,2 mm de espessura e com orifício central de 1,1 cm de diâmetro o qual serve para marcar o local para colocar a amostra (STULZER; GONÇALVES; FERREIRA 2006); (BORGHETTI; KNORST, 2006).

As amostras foram introduzidas no orifício do molde na quantidade de 1g. O molde, então, foi retirado e sobre a amostra colocada uma placa de vidro com um pesos padronizados de 200 e 500g, onde após um minuto da adição de cada Placa, calculou-se o diâmetro em duas direções diferentes, por meio do papel milimetrado. A área de espalhabilidade foi calculada a partir da equação 4.1:

$$E_i = \frac{d^2 \times \pi}{4}$$

Onde: E_i = Espalhabilidade da amostra para o peso i (mm^2); d = diâmetro médio (mm).

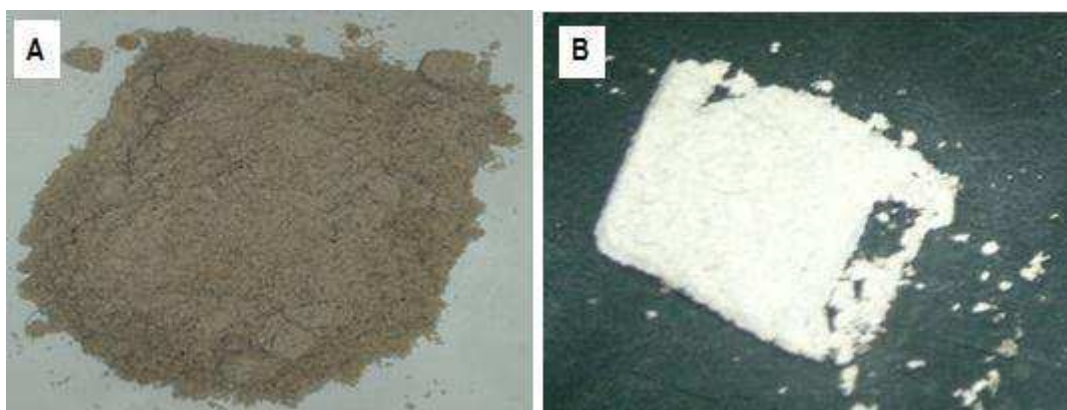
5.RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO PROTEICA DA APITOXINA

A partir da técnica desenvolvida pelo apicultor responsável do apiário em estudo há um incremento no rendimento da coleta da apitoxina em torno de 40%, o que representará um ganho financeiro substancial para os apicultores.

A apitoxina tipo 02, antes e após o processo de beneficiamento, está apresentada na Figura 5.1, e são visualmente distintas apresentando colorações diferenciadas.

Figura 5.1 - Apitoxina tipo 02 antes (A) e após (B) ao beneficiamento



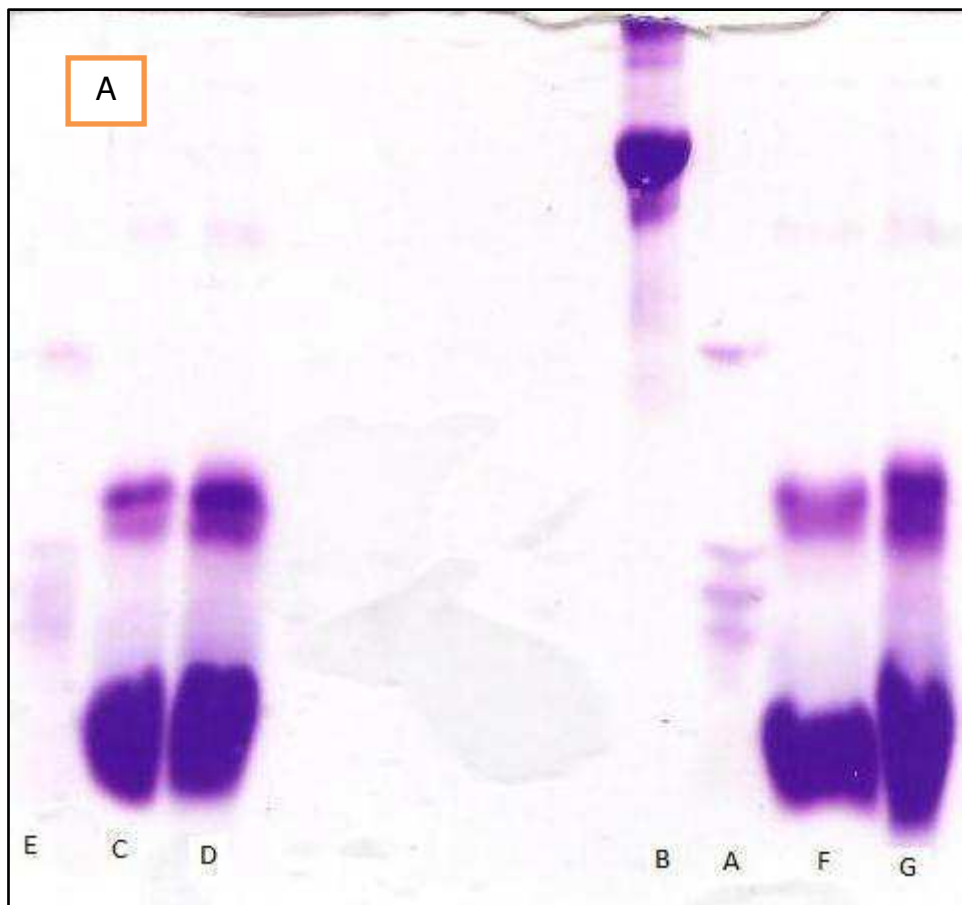
Fonte: Arquivo Apiário El – Shaday

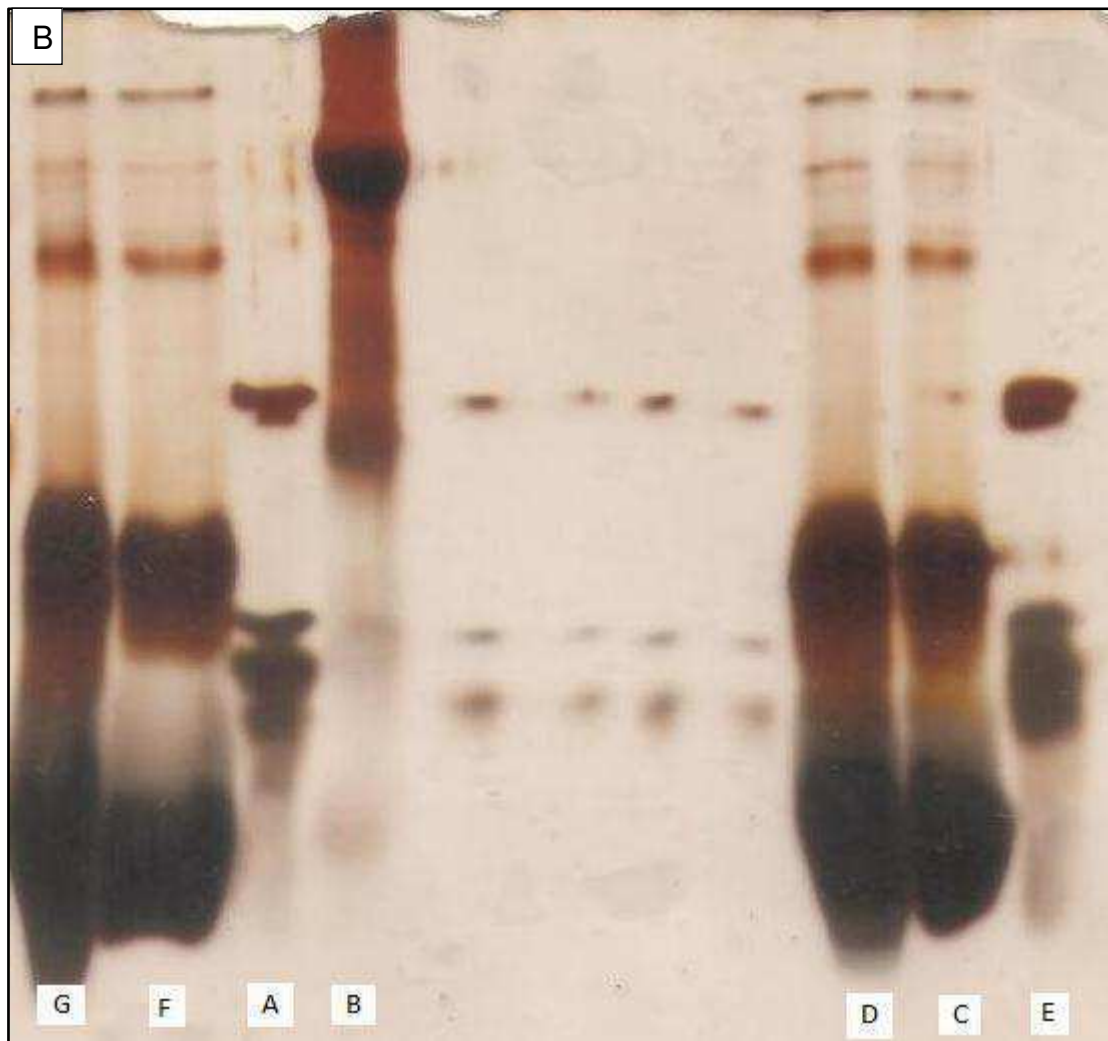
Pode-se observar que após o beneficiamento na figura 5.1 a apitoxina, antes de coloração escura, passa a apresentar coloração branca clara, com diminuição de impurezas apresentando características sensoriais próprias do produto.

As amostras de apitoxina foram comparadas com relação ao seu teor de proteínas e a apitoxina tipo 01 apresentou 77,83% ($\pm 0,93$) de proteínas, enquanto a apitoxina tipo 02 apresentou 51,87% ($\pm 0,56$) de proteína, essa redução no teor proteico possivelmente se deu pela presença de impurezas ainda presente na amostra após o processo de beneficiamento realizado no apiário.

A análise de eletroforese das proteínas da apitoxina tipos 01 e 02 estão apresentadas na Figura 5.2.

Figura 5.2 -Análise eletroforética em sistema PAGE-SDS-2 β Me das proteínas presentes nos tipos 01 e 02 de apitoxina coradas em (A) Comassie e em (B) nitrato de prata (Legenda: Faixas C e F – apitoxina tipo 01; faixas D e G – apitoxina tipo 02; Faixas A e E – padrão sigma e Faixa B – albumina bovina)

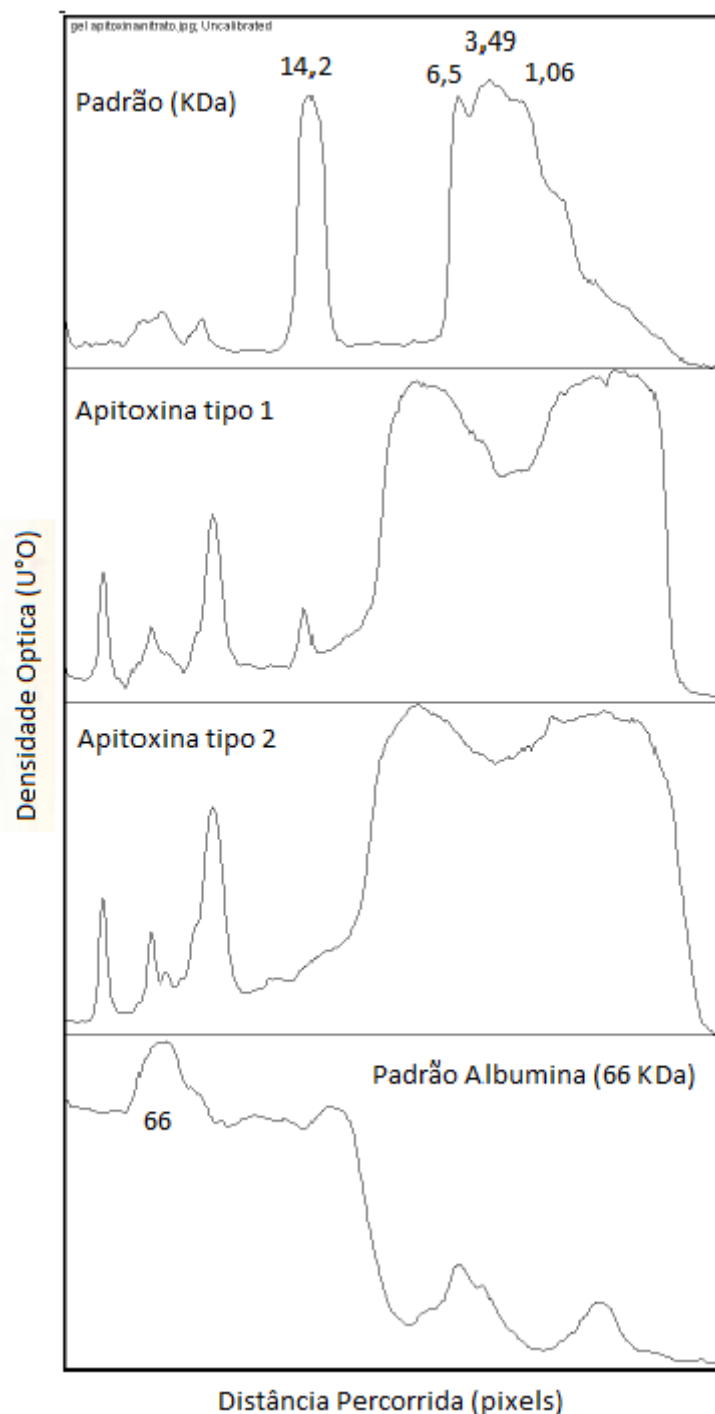




Foi possível observar a partir das unidades reveladas no gel que quando corado com o corante ComassieBrilhant Blue (Figura 8 A) algumas bandas não apareceram expressivamente como quando corado com nitrato de prata (Figura 8 B). Sendo assim, utilizou-se o gel corado com o nitrato de prata para realização da análise densitométrica.

As bandas de polipeptídios reveladas, mais e menos proeminentes, dos produtos também são indicadas através da Figura 5.3, relacionadas à análise densitométrica, em que os picos representam as subunidades proteicas separadas, apresentandoas características de mobilidade eletroforética das proteínas constituintes dos produtos analisados mais perceptíveis.

Figura 5.3 - Análise densitométrica da eletroforese em gel de poliacrilamida, em sistema PAGE-SDS-2 β Me das proteínas presentes nos tipos 1 e 2 e padrões



A partir do gráfico apresentado na Figura 9, observa-se que a apitoxina apresenta o mesmo perfil proteico, independente do processo de extração. Porém, na apitoxina tipo 02, que é obtida através de um processo de beneficiamento diferenciado, apresenta a diferença de uma unidade que não se

revelou neste produto. Podemos observar também, que as frações de menores pesos moleculares se apresentam bem pronunciadas indicando a presença da melitina, correspondente a quase 50% das proteínas da apitoxina e que neste caso, apresentou quantidades reveladas bem semelhantes nos dois tipos estudados.

Os dados representados na Tabela 5.1, referentes aos pesos moleculares e índices percentuais das unidades polipeptídicas reveladas, foram obtidos a partir da análise densitométrica. No geral, foram observadas pequenas diferenças qualitativas nos perfis apresentados.

Tabela 5.1 - Unidades polipeptídicas reveladas (kDa) nas apitoxinas tipo 01 e 02

Unidades Reveladas (KDa)	Distribuição e Conteúdo revelado (%)	
	Apitoxina tipo 1	Apitoxina tipo 2
119,43	2,80	3,01
75,73	2,26	2,26
40,99	7,34	11,70
16,81	1,22	-
14,2 - 10	32,87	32,85
Menor que 10	53,52	50,18

Observamos que na faixa de peso molecular inferior a 10KDa, na qual encontra-se numerosos polipeptídios como a apamina, mas com ampla predominância da melitina (MAIA, 2012), as amostras de apitoxina avaliadas apresentaram resultados bem semelhantes, 53,52% na apitoxina tipo 01 e 50,18% na apitoxina tipo 02, índices de suma importância, visto que a melitina é considerada um marcador de qualidade da apitoxina. Acima de 10 KDa ocorrem diversas enzimas, como a fosfatase ácida, α – glucosidase, estearases, outras substâncias como a adolapina, inibidor da protease, mas o predomínio é da fosfolipase A2, que representa cerca de 12% da base seca do veneno, segundo alguns autores, este número pode variar de 1,8 a 27,4% p/p,

sendo geralmente maiores nas abelhas africanas que nas europeias, seguida pela hialuronidase com cerca de 2% (MAIA, 2012). A eletroforese das amostras do apiário El-shadai também demonstraram valores bem próximos com a diferença de um pico próximo a 16 Kda que não se revelou na apitoxina tipo 02.

5.2 TOXICIDADE FRETE A *ARTEMIA SALINA*

Estão representados na Tabela 5.2 e 5.3, a mortalidade (número de indivíduos mortos) e a taxa de mortalidade (número de indivíduos mortos comparados com o total de indivíduos na amostra) de *Artemia salina* L. nas concentrações testadas para a avaliação toxicológica da apitoxina tipo 01 e apitoxina tipo 02 consecutivamente.

Tabela 5.2 - Mortalidade e taxa de *Artemia salina* L. nas concentrações testadas para a avaliação toxicológica da apitoxina tipo 01

Concentração da amostra (µg/mL)	Mortalidade	Taxa de Mortalidade (%)
2500	9,33 ± 0,58	93,3
1250	9,00 ± 1,73	90,0
250	1,67 ± 2,89	16,7
125	2,67 ± 3,06	26,7
62,5	2,67 ± 0,58	26,7
31,25	0,00 ± 0,00	0
0	0,00 ± 0,00	0

Tabela 5.3 - Mortalidade e taxa de *Artemia salina* L. nas concentrações testadas para a avaliação toxicológica da apitoxina tipo 02

Concentração da amostra (µg/mL)	Mortalidade	Taxa de Mortalidade (%)
2500	10,00 ± 0,00	100,0
1250	10,00 ± 0,00	100,0
250	6,00 ± 4,58	60,0
125	6,00 ± 2,08	60,0
62,5	5,33 ± 2,31	53,3

31,25	2,00 ± 1,73	20,0
0	0,00 ± 0,00	0

Comparando os valores obtidos nas Tabelas 5.2 e 5.3 temos que a apitoxina tipo 2 apresentou taxa de mortalidade a partir da concentração de 31,25 µg/mL de amostra, enquanto a apitoxina tipo 01 só apresenta taxa de mortalidade a partir da concentração de 62,5 µg/mL de amostra, sendo essa taxa superior a 50% a partir da concentração de 1250 µg/mL de amostra.

No ensaio de toxicidade sobre *Artemia salina* L. os índices de mortalidade variaram entre 0e 93,3%, A apitoxina 01 apresentou DL₅₀ de 962,60 µg/mL e a apitoxina 02 DL₅₀ de 154,82 µg/mL como apresentado na Tabela 5.4

Tabela 2.4 - Valor de DL₅₀ calculados para apitoxina tipo 01 e 02 com respectivos limites de confiança

Amostra	DL ₅₀ (µg/mL)	
Apitoxina 01	962,60	(limite inferior 603,46 - limite superior 1321,74)
Apitoxina 02	154,82	(limite inferior -272,09 – limite superior 581,74)

Segundo Siqueira et al. (2001) e Moreira et al. (2003), para produtos bioativos, um valor de DL₅₀ acima de 500 µg/mL é considerado como um produto de baixa citotoxicidade e valores abaixo de 50,02 µg/mL como um produto citotóxico, logo de acordo com esta classificação, a apitoxina 01 pode ser considerada um produto de baixa citotoxicidade com a DL₅₀ de 962,60 µg/mL e a apitoxina 02, apesar de apresentar um resultado que demonstra uma maior toxicidade, 154,82 µg/mL, ainda não é considerado um produto tóxico.

Deve-se ser levada em consideração na avaliação do resultado da apitoxina 02 a possível presença de impurezas, como metais, oriundas da raspagem das hastes do coletor no apiário. Sugere-se que a metodologia de beneficiamento deste produto seja acompanhada para diminuir as impurezas nele contido e assim, conseguir um maior rendimento do produto ao apicultor.

5.3 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

A Tabela 5.5 apresenta a atividade antimicrobiana in vitro da apitoxina tipo 1 frente às cepas de *E. coli*, *S. enteritidis* e *S. typhi*.

Tabela 5.5 -Concentração Inibitória Mínima(CIM) da apitoxina tipo 01 frente *E. coli*, *S. enteritidis* e *S. typhi*.

Cepas	Concentrações testadas (%)								CIM
	Controle	0,02	0,03	0,06	0,13	0,25	0,50	1,00	
<i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	1%
<i>Salmonella enteritidis</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	1%
<i>Salmonella typhi</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	1%

*Sinais positivos (+) indicam crescimento microbiano nas respectivas concentrações; **Sinais negativos (-) indicam inibição do crescimento microbiano nas respectivas concentrações

Os resultados evidenciaram crescimento bacteriano de todas as cepas em concentrações inferiores a 1,00%, sendo esta a Concentração Inibitória Mínima da apitoxina tipo 01 (comercial) in vitro. Leandro et al. (2015) testaram a apitoxina *in natura*, apitoxina comercial e os componentes da apitoxina de forma isolada frente a cepas de microrganismos responsáveis pela contaminação da cavidade oral, *S. salivarius*, *E. faecalis*; *L. casei*, *S. sanguinis*, *S. sobrinus*, *S. mitis*, *S. mutans*. Tanto apitoxina *in natura* quanto a comercial inibiram o crescimento bacteriano em concentrações mínimas de 20 µg/mL (0,2%), os organismos contaminantes da cavidade oral mostraram-se mais sensíveis à apitoxina quando comparados aos testados deste estudo.

Já o estudo realizado por Felice Pandim (2012) mostrou resultados iguais com as mesmas cepas testadas, a solução de apitoxina a 1% exerceu um efeito bactericida em *E. coli* e *S typhina* concentração de 0,62 mg/mL e ainda em outros microrganismos gram positivos e gram negativos.

5.4 TESTES DE CENTRIFUGAÇÃO E ESTABILIDADE PRELIMINAR

As amostras das duas formulações de apitoxina a 0,1 %, Emulsão Aniônica e Gel carbopol 940[®], foram submetidas ao teste de centrifugação durante 30 minutos e ambas as formulações permaneceram estáveis após a análise caracterizando que não houve alterações aparentes na incorporação deste princípio ativo as bases escolhidas.

Em seguida foram realizados testes de estabilidade preliminar, os quais os resultados podem ser observados na Tabela 5.6. As amostras submetidas as análises não apresentaram sinais de instabilidade e foram consideradas aptas para realização dos ensaios de estabilidade acelerada.

Tabela 5.6 - Resultado dos testes de estabilidade preliminar

Parâmetros Avaliados	Bases utilizadas	
	Emulsão aniônica	Gel Carbopol 940 [®]
Características Organolépticas		
Inicial	Padrão	Padrão
Final	Padrão	Padrão
Ph		
Inicial	6,70 ($\pm 0,10$)	6,40 ($\pm 0,20$)
Final	6,60 ($\pm 0,20$)	6,50 ($\pm 0,20$)
Viscosidade		
Inicial	153	350
Final	152	348

P – Padrão/M – Modificado/IM – Intensamente Modificado
Viscosidade em Poise (P)

Observamos na Tabela 5.6 que os caracteres organolépticos mantiveram-se inalterados no início e final do teste de estabilidade preliminar, apresentando-se de acordo com o padrão (P) especificado no início do estudo.

O pH das formulações variou menos de 10% entre o início e final dos testes mantendo-se na faixa compatível com o pH da pele, resultado semelhante foi observado pela viscosidade das formulações em estudo que também não apresentou variação que sugerisse algum sinal de instabilidade de ambas as formulações.

5.5 TESTES DE ESTABILIDADE ACELERADA

5.5.1 Caracteres Organolépticos

As formulações de apitoxina, Gel carbopol 940[®] e a Emulsão Aniônica, foram analisados frente a padrões (controle sem a incorporação da apitoxina) armazenados em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Os resultados expostos na Tabela 5.7 e classificados em: (P) semelhante ao Padrão, (M) modificado, (IM) intensamente modificado.

Tabela 5.7 - Resultado das características organolépticas das formulações em estabilidade acelerada

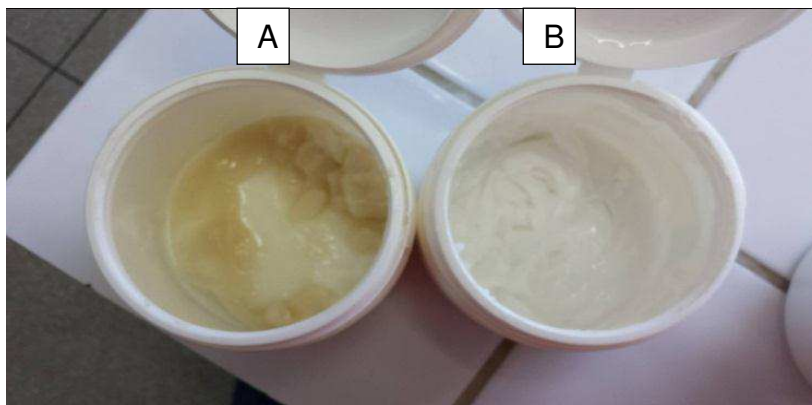
Temperaturas Avaliados	Bases utilizadas	
	Emulsão Anionica	Gel Carbopol940 [®]
Inicial		
5 °C	P	P
25 °C	P	P
40 °C	P	P
Final		
5 °C	P	M
25 °C	P	P
40 °C	IM	M

Legenda: P – Padrão/ M – Modificado/ IM – intensamente modificado

As amostras mantidas à temperatura ambiente permaneceram inalteradas durante todo o período de estudo da estabilidade (90 dias). A emulsão aniônica conservada a 5°C também não demonstrou sinais de instabilidade mantendo inalterados seus caracteres organolépticos durante os noventa dias de análises. Entretanto, a emulsão Anionica mantida a 40°C apesentou alteração na cor, intensa separação de fases, gotículas de água e tom amarelado após o sexagésimo dia de análise, perdendo o seu aspecto homogêneo, evidenciando sinais de instabilidade, como observamos na Figura 5.4. Zaninet *al.* (2001), estudaram os parâmetros físicos da estabilidade das

emulsões inertes, ou seja, sem nenhum princípio ativo incorporado. No teste de estabilidade acelerada, tanto a Emulsão aniônica quanto a não iônica acondicionadas em estufa a 50°C apresentaram perda de homogeneidade e brilho, desvirtuando do produto inicial.

Figura 5.4—Formulação da apitoxina com a Emulsão aniônica conservada a temperatura de 40°C (A) e Emulsão aniônica padrão (B)



Fonte: Autoria própria

A formulação com o gel Carbopol 940[®] mantido a temperatura de 40°C apresentou uma moderada alteração na sua cor apresentando-se com tom amarelado como pode ser visto na Figura 5.5, foto capturada no sexagésimo dia de análise. Entretanto, manteve inalterado o odor e consistência, sem sinais de separação de fases.

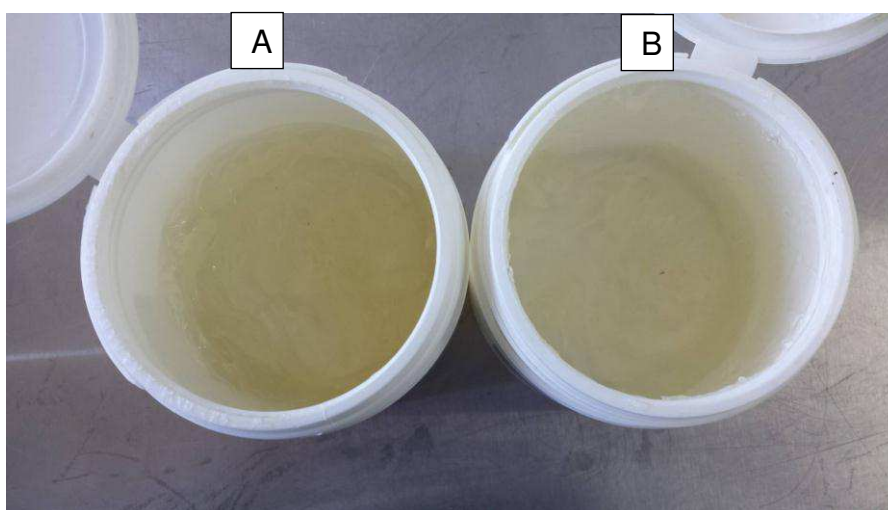
Figura 5.5 - Formulação da apitoxina com Gel carbopol 940[®] conservado a temperatura de 40°C (A) e Emulsão aniônica padrão (B)



Fonte: Autoria própria

A formulação com o gel Carbopol 940[®] acondicionado a 5°C revelou uma suave alteração na sua coloração, com leve tom amarelado, conservando odor ausência de sinais de separação de fases (Figura 5.6).

Figura 5.6 - Formulação da apitoxina com Gel carbopol 940[®] conservado a temperatura de 5°C (A) e Emulsão aniônica padrão (B)



Fonte: Autoria própria

Em 2013, CORDEIRO *et al.* relatou em seu estudo de estabilidade em um gel dermatológico, formulado a partir do óleo essencial de Gengibre em Gel Carbopol 940[®], no qual esse estudo de estabilidade acelerada apresentou a partir do trigésimo dia de análises modificações não significativas na coloração do gel, algo perfeitamente corrigível com a adição de conservantes. No que concerne aos caracteres organolépticos, podemos afirmar que apenas a emulsão aniônica acondicionada a 40°C tornou-se instável, as demais amostras tiveram o comportamento esperado e mantiveram suas características organolépticas conservadas durante o período de avaliação.

A emulsão aniônica conservada a 5°C também não demonstrou sinais de instabilidade mantendo inalterados seus caracteres organolépticos durante os noventa dias de análises.

5.5.2 Análise do pH

Na Tabela 5.8e Figura 5.7 apresentamos os valores do pH nas formulações de apitoxina 0,1% em gel Carbopol 940[®].

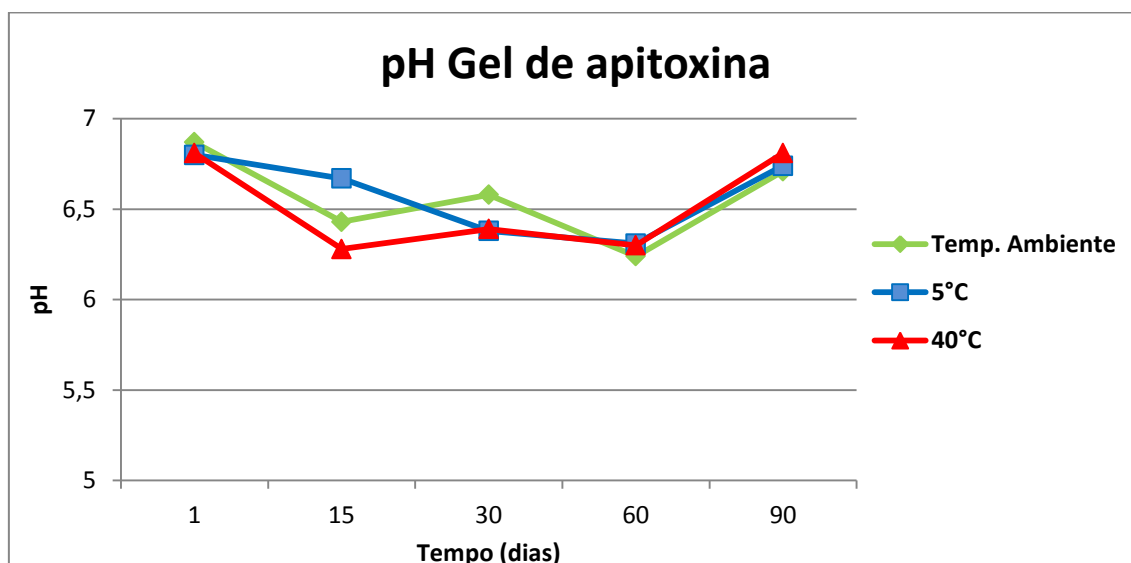
Tabela 5.8 - Variação do pH da formulação de apitoxina 0,1% em gel Carbopol 940[®]

Temperaturas Avaliadas	Tempo				
	1 dia	15 dias	30 dias	60 dias	90 dias
5 °C	6,81 ^a ± 0,2	6,71 ^a ± 0,3	6,42 ^a ± 0,1	6,32 ^a ± 0,2	6,34 ^a ± 0,2
25 °C	6,81 ^a ± 0,2	6,42 ^a ± 0,2	6,64 ^a ± 0,1	6,21 ^a ± 0,1	6,70 ^a ± 0,2
40 °C	6,81 ^a ± 0,2	6,33 ^a ± 0,2	6,40 ^a ± 0,3	6,21 ^a ± 0,1	6,82 ^a ± 0,2

Resultados expressos através da média ± desvio padrão em triplicada.

Letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Turkey a 5% e significância.

Figura 5.7 - Variação do pH nas formulações em Gel Carbopol 940 em função do tempo e temperatura de acondicionamento



As condições de armazenamento avaliadas não apresentaram variação de pH superior a 10%, restringindo-se ao intervalo compreendido entre 6,21 e 6,81, resultados compatíveis com o pH cutâneo (CORDEIRO, 2013). Cordeiro *et al.* (2013) realizaram testes de estabilidade acelerada em formulação contendo Óleo essencial de gengibre em Gel Carbopol 940[®], evidenciando oscilações entre 5,7 e 7,1, não apresentando sinais de instabilidade.

Os resultados obtidos nas análises das emulsões aniônicas estão apresentados na Tabela 5.9 e Figura 5.8.

Tabela 5.9 -Variação do pH da formulação de apitoxina 0,1% em emulsão aniônica

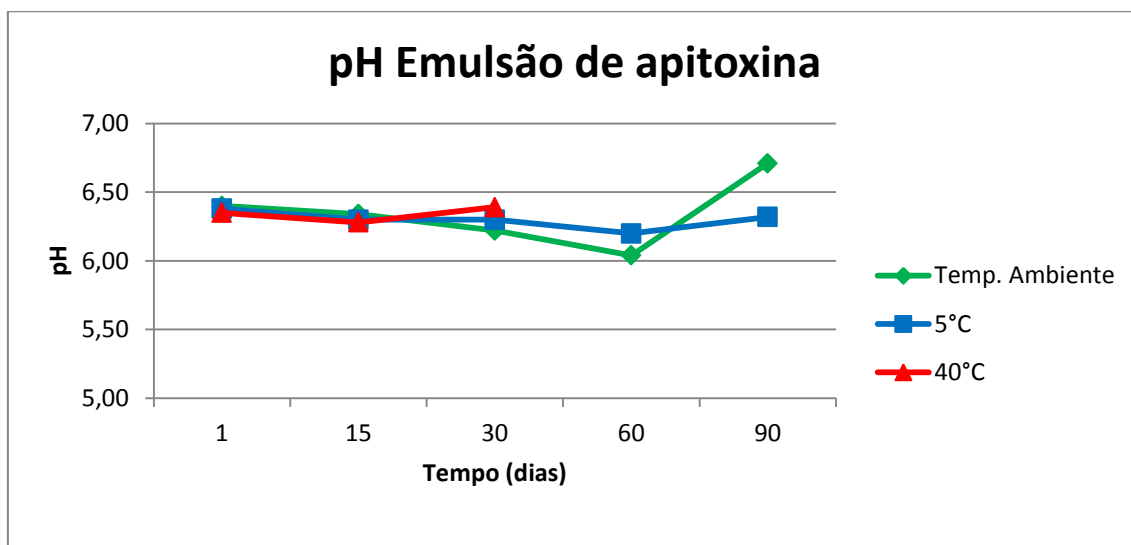
Temperaturas Avaliadas	Tempo				
	01 dia	15 dias	30 dias	60 dias	90 dias
5 °C	6,42 ^a ± 0,2	6,13 ^a ± 0,2	6,31 ^a ± 0,2	6,22 ^a ± 0,2	6,61 ^a ± 0,1
25 °C	6,42 ^a ± 0,2	6,34 ^a ± 0,2	6,21 ^a ± 0,1	6,00 ^a ± 0,2	6,31 ^a ± 0,2
40 °C	6,42 ^a ± 0,2	6,32 ^a ± 0,2	6,41 ^a ± 0,3	-	-

(-) Excluído do teste por perda de estabilidade

Resultados expressos através da média ± desvio padrão em triplicada.

Letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Turkey a 5% e significância.

Figura 5.8 - Variação do pH na Emulsão de apitoxina a 0,1% em função do tempo e temperatura de acondicionamento



Não ocorreram alterações significativas em relação ao pH das emulsões aniônicas acondicionadas na temperatura ambiente, que teve o seu pH compreendido entre 6,00 e 6,42, bem como naquela armazenada a 5°C que apresentou valores mínimos de 6,13 e máximo de 6,61 no nonagésimo dia, os valores não apresentaram alteração superior a 10% sugerindo a não formação de compostos de degradação.

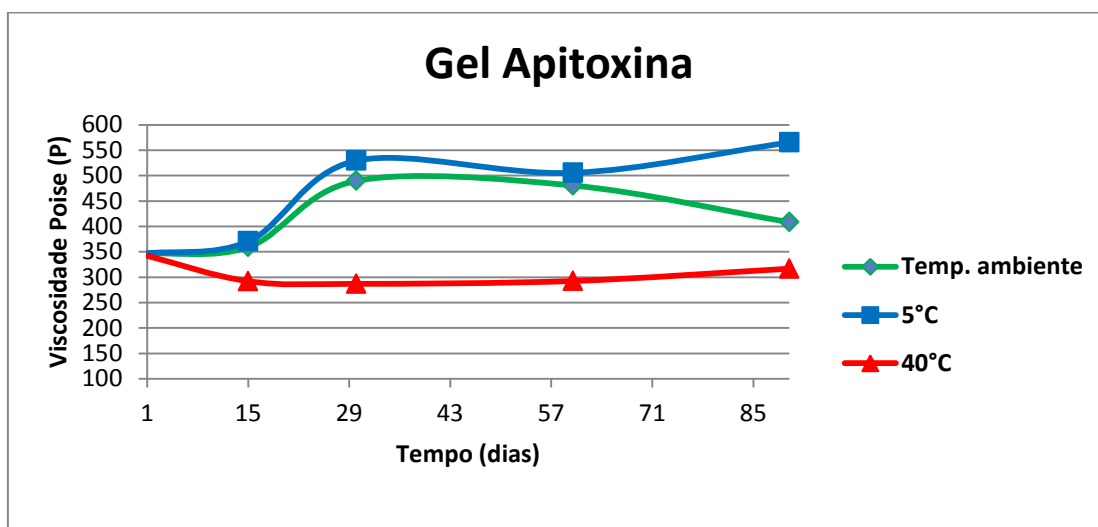
No entanto, a emulsão aniônica acondicionada na temperatura de 40°C, corroborando com os resultados obtidos nos testes organolépticos, apresentou sinais de instabilidade a partir do 30° dia e foi excluída do teste.

Frangé e Garcia (2009) avaliando a estabilidade física de uma emulsão de Óleo de Oliva em água, observaram no estudo da estabilidade acelerada uma ligeira alteração no pH dos sistemas acondicionados em estufa e refrigerador o que é indicativo de instabilidade podendo representar uma oxidação da fase oleosa da emulsão.

5.5.3 Análise da Viscosidade

Os resultados obtidos na determinação da viscosidade dos géis em suas diferentes condições de armazenamentos seguem ilustradas na figura 5.9.

Figura 5.9 - Variação da viscosidade dos Géis de apitoxina a 0,1% em relação ao tempo e temperatura de armazenamento

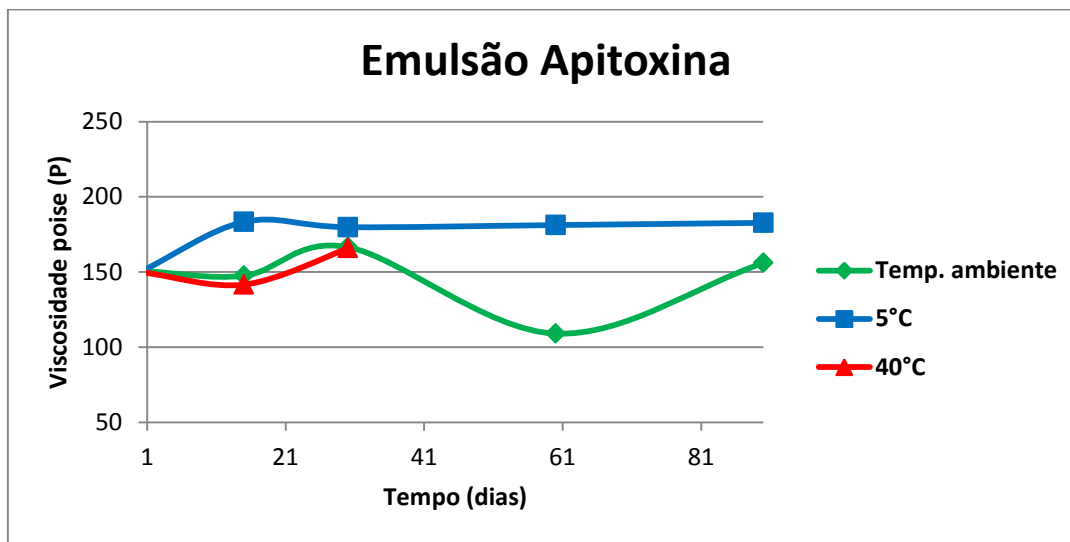


A formulação de apitoxina a 0,1% manipulada em Gel carbopol 940[®] e acondicionada à temperatura de 5°C foi aquela que apresentou a maior elevação de viscosidade entre as amostras analisadas, oscilando entre 346,0 Poise (P) no início dos testes e atingindo o valor de 565,3 P no nonagésimo dia de análise. O Gel carbopol 940[®] acondicionado à temperatura ambiente também apresentou elevação na sua viscosidade, porém de forma mais sutil, ficando seus valores compreendidos entre 346,0 P no início dos testes, pico máximo de 489,7 P no trigésimo dia de análises e retornando ao patamar de 408,3 P na última análise realizada.

A amostra acondicionada a 40°C, como já era esperado, apresentou leve queda de viscosidade no decorrer dos testes, finalizando os mesmos com uma viscosidade de 316,8 P. As amostras tiveram um comportamento dentro da normalidade e mantiveram a viscosidade, mesmo àquela acondicionada a 40 °C, o que aponta para a boa estabilidade física da preparação em Gel Carbopol[®].

A Figura 5.10 apresentam os resultados Obtidos na Emulsão Anionica de apitoxina 0,1%.

Figura 5.10 - Variação da viscosidade das Emulsões aniônicas de apitoxina a 0,1% em relação ao tempo e temperatura de armazenamento



A amostra acondicionada à 5 °C manteve-se estável durante todo o processo, apresentando uma pequena variação na sua viscosidade que variou entre 150,0 P no primeiro dia de análise e 182,7 P no nonagésimo dia.

A amostra acondicionada em temperatura ambiente teve comportamento semelhante àquela acondicionada a 5 °C apresentando pouca variação entre a aferição inicial e final, 150,0 P e 156 P respectivamente, tendo uma pequena queda de viscosidade no trigésimo dia de análise atingindo o patamar mínimo de 109,0 P; mantendo-se, portanto estável durante o período de testes de estabilidade acelerada. A amostra de Emulsão aniônica acondicionada a 40°C apresentou sinais de instabilidade ao sexagésimo dia sendo portanto excluída dos testes a partir desta data.

5.5.4 Espalhabilidade

Pela análise da espalhabilidade percebem-se diferenças de comportamento entre as formulações influenciadas pelas condições de armazenamento e pela natureza das bases utilizadas. Primeiramente é possível observar que nas três condições de armazenamento avaliadas, as

emulsões aniônicas contendo apitoxina a 0,1% apresentaram uma espalhabilidade maior em relação aos géis carbopol 940®.

Podemos observar na tabela 5.10 os resultados obtidos nas análises das amostras acondicionadas a temperatura ambiente

Tabela 5.10 - Espalhabilidade na temperatura ambiente em relação ao peso adicionado

Forma farmacêutica	Tempo em dias	Espalhabilidade (mm ²)	
		200 g	500 g
Gel Carbopol ®	0	1989 ± 231	2550 ± 341
	15	1734 ± 252	2205 ± 312
	30	1962 ± 270	2920 ± 370
	60	1808 ± 320	2289 ± 381
	90	1962 ± 210	2289 ± 402
Emulsão Anionica	0	3808 ± 431	4776 ± 500
	15	3962 ± 420	4183 ± 510
	30	3808 ± 460	4534 ± 507
	60	3450 ± 410	4298 ± 498
	90	2555 ± 392	4183 ± 421

Há uma pequena diminuição na espalhabilidade com o decorrer do tempo observado tanto na emulsão aniônica quanto no gel carbopol, mas nada que influencie de forma negativa na utilização dessas amostras.

A tabela 5.11 apresenta os resultados obtidos na temperatura de 5°C

Tabela 5.11 - Espalhabilidade a 5°C em relação ao peso adicionado

Forma farmacêutica	Tempo em dias	Espalhabilidade (mm ²)	
		200 g	500 g
Gel Carbopol ®	0	1889 ± 205	2550 ± 302
	15	1451 ± 210	2289 ± 308
	30	1884 ± 230	2289 ± 310
	60	1920 ± 260	3419 ± 347
	90	1589 ± 221	1962 ± 298
Emulsão Anionica	0	3502 ± 407	3808 ± 480
	15	4069 ± 434	4654 ± 501
	30	4183 ± 447	4775 ± 508
	60	3957 ± 416	4654 ± 502
	90	3132 ± 398	3846 ± 497

A baixa temperatura de 5°C influenciou o comportamento do gel Carbopol 940®, diminuindo de forma mais significativa sua espalhabilidade, enquanto que a emulsão aniônica apresentou um aumento de sua espalhabilidade entre o 15° e 60° dias voltando a valores semelhantes aos iniciais na última análise.

Os resultados apresentados na tabela 5.12 nos mostra que o Gel carbopol reagiu bem a influencia da temperatura elevada e manteve estável a sua espalhabilidade.

Tabela 5.12 - Espalhabilidade a 40°C em relação ao peso adicionado

Forma farmacêutica	Tempo em dias	Espalhabilidade (mm ²)	
		200 g	500 g
Gel Carbopol ®	0	1889 ± 210	1989 ± 287
	15	1734 ± 200	2122 ± 301
	30	1808 ± 215	2374 ± 298
	60	1734 ± 198	2041 ± 310
	90	2040 ± 200	2374 ± 300
Emulsão Anionica	0	3808 ± 400	4776 ± 501
	15	5941 ± 410	7386 ± 597
	30	5805 ± 390	7426 ± 578
	60	*	*
	90	*	*

(*) Excluídos do teste por perda de estabilidade

No entanto, Emulsão aniônica, assim como observamos nos testes de viscosidade, pH e caracteres organolépticos apresentou-se mais susceptível a influencia da temperatura elevada e aumentou de forma considerável a sua espalhabilidade, apresentando aspecto fibroso e grosso alterando completamente suas características de espalhabilidade e impossibilitando sua continuação nos testes após o 30° dia, comportamento semelhante ao obtido por Zanin, quando estudou os parâmetros físicos da estabilidade das emulsões em 2001.

6.CONCLUSÕES

Os resultados dos testes com as amostras de apitoxina tipo 01 e tipo 02, pura e beneficiada respectivamente, apontam para uma viabilidade da técnica empregada no apiário El-shadai, visto que a apitoxina beneficiada (tipo 02) quando comparada à apitoxina (tipo 01), apresentou resultados satisfatórios no tocante ao seu teor proteico, tanto na quantificação realizada pelo método de Micro-Kjeldahl quanto na eletroforese, atendendo as especificações da INSTRUÇÃO NORMATIVA N.º 3, de 19 de janeiro de 2001 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA que requer um teor proteico mínimo de 50% para caracterização da apitoxina. Ambas as amostras foram consideradas produtos de baixa citotoxicidade no teste frente à *Artemia salina*, apesar da apitoxina tipo 02 apresentar um DL₅₀ maior quando comparada com o tipo 01. Não obstante, faz-se necessário um aprimoramento da técnica principalmente no tocante a padronização da metodologia e materiais empregados na operação a fim de que os resultados alcançados sejam ainda mais significativos, obtendo-se uma apitoxina beneficiada, com seus constituintes proteicos e não proteicos conservados assemelhando-se à apitoxina tipo 01, a fim de que possa ser comercializada de forma segura e com um maior valor de mercado.

A apitoxina tipo 01 mostrou-se efetiva contra as cepas de bactérias testadas na concentração inibitória mínima de 1,0%.

As formulações contendo apitoxina a 0,1%, Emulsão Anionica e Gel carbopol 940®, mostraram-se estáveis durante os testes de centrifugação, estabilidade preliminar e estabilidade acelerada nas diferentes condições de armazenamento, como preconiza o manual da Agencia Nacional de Vigilância (ANVISA). Exceção feita à emulsão aniônica quando submetida a condições de temperaturas elevadas por um período superior a trinta dias, o que pode ser considerado um fator limitante à validade do produto que utilizar esta forma farmacêutica como veículo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU R. M., MORAES R. L. M. S. & MATHIAS, M. I. C. (2010) **Biochemical and cytochemical studies of the enzymatic activity of the venom glands of workers of honey bee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae).** Micron

ALI, M.A; **Studies on Bee Venom and Its Medical Uses**, International Journal of Advancements in Research & Technology, Volume 1, Issue2, July-2012

ANSEL, H.C; POPOVICH, N.G; ALLEN, L.V; **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos.** 6ª ed. São Paulo: Premier, 2000

AOAC - Association Of Oficial Analytical Chemistral. **Official methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemistry.**11. ed. Washington: AOAC, 1992. 1115 p.

BARBOSA, F.S; **Modelo de impedância de ordem fracional para a resposta inflamatória cutânea/ Fernanda de Souza Barbosa.** – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2011. XI, 107 p.: il; 29,7 cm

BADRAN M. M, KUNTSCHKE J; FAHR A; **Skin penetration enhancement by a microneedle device (Dermaroller®) in vitro: Dependency on needle size and applied formulation.** European Journal PharmacieScience. 2009; 36(4-5):511-23

BECK, B.F; **The bible of bee venom therapy: bee venom, its nature, and its effect on arthritic and rheumatoid conditions.** New York: Health Resources Press, 1997.260p.

BORGHETTI, G.S. & KNORST, M.T. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de loções O/A contendo filtros solares.** Rev. Bras. Cien. Farma. 42(4): p. 531-537, 2006.

BRASIL; Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. -- 1. ed. --** Brasília: ANVISA, 2004. 52 p. ; 20 x 27 cm. -- (Série Qualidade em Cosméticos ; v. 1) ISBN 85-88233-15-0 I. Séries Temáticas. II. Cosméticos

CALDERON, F; SCHMITT, V; BIBETT, J. (2007). **Emulsion Science – Basic Principles (2ª edição)**. New York: Springer Science, LLC.

CARMINI, M.O.; JORGE, M.C.G. **Cremes e emulsões cosméticas: conceitos básicos**. Cosmetic&Toiletries, São Paulo, v. 1, n. 5, p. 13-22, 1989.

CHORILLI, M., **Aspectos gerais em sistemas transdérmicos de liberação de fármacos**, Rev. Bras. Farm., 88(1): 7-13, 2007.

CORDEIRO *Et al*, **Desenvolvimento tecnológico e avaliação de estabilidade de gel dermatológico a partir do óleo essencial de gengibre (ZingiberoficinalleRoscoe)**; Rev. Bras. Farm. 94 (2): 148-153, 2013.

CORREA, N.M; CAMARGO F. B; IGNACIO R. F; LEONARDI G.R; **Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos**. Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas, vol 41, nº01, jan/mar 2005.

DANTAS C. G, NUNES G. M, NUNES T. M, GOMES M.Z, GRAMACHO K.P, **Apitoxina: Coleta, Composição Química, Propriedades Biológicas e Atividades Terapêuticas**, Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais - Junho, Julho, Agosto, Setembro, Outubro, Novembro de 2013, v. 4, n. 2 (2013).

DÁVILA, M ; MARCHINI L. C., **Polinização realizada por abelhas em culturas de importância econômica no Brasil**. Boletim da Indústria animal. Nova Odessa, v.62, n.1, p.79-90, 2005.

DOLABELA, M. F; **Triagem *in vitro* para atividade antitumoral e antiTrypanossomacruzi de extratos vegetais, produtos naturais e substâncias sintéticas**. UFMG, Belo Horizonte, 1997.

FELICE L.J; PADIN J; **Apitoxina su preparado, especificaciones y farmacologia**. Ediciones Argentina e Americanas – 1ª edição, 2012.

FERREIRA, D. B; COSTA, R. S; OLIVEIRA, J.S. M; MUCCILLO, G;**Na infarct-likemyocardiallesionexperimentallyinduced in WinstarratswithAfricanizedbee venom**. JournalofPathology, v.177,n.1, p. 95-102, 1995

FERREIRA, A.O; SOUTO, G. F;**Preparações orais liquidas**. 2ª ed. São Paulo: Pharmabooks, 2007.

FITZGERALD, K. T.; FLOOD, A. A; **Hymenoptera Stings.Clinical Techniques in SmallAnimal Practice**, v. 21, n. 4, p. 194-204, 2006.

FONSECA, V. L. I ; RAMALHO, M; KLEINERT-GIOVANNI, A;**Flores e abelhas em São Paulo**. São Paulo: EDUSP/FAPESP, 1993. cap. 1, p. 17-30: Abelhas sociais e floresanálise polínica como método de estudo.

FRANÇA, F.O.S.; MEDEIROS, C.R. **Acidentes por Abelhas e Vespas**. In: Cardoso J.L.C.; França F.O.S.; Málaque C. M. S.; Jr. Haddad V.; Wen F.H.**Animais Peçonhentos no Brasil**. 1ª Edição. Sarvier, c. 26, p. 244-245, 2003.

Frange, R.C.C ; Garcia, M.T.J; **Desenvolvimento de emulsões óleo de oliva/água: avaliação da estabilidade física, Laboratório de Tecnologia Farmacêutica - Faculdade de Farmácia - Universidade de Uberaba – UNIUBE**. Rev Ciênc Farm BásicaApl., 2009;30(3):263-271 ISSN 1808-4532

FREE, J. B;**The social organization of honeybees**.1 ed. São Paulo: EPU - Editora da Universidade de São Paulo, 1980.

GONÇALVES, L. S;**Comments on the aggressiveness of the Africanized bees in Brazil**.American Bee Journal, v.114, p.448-450, 1974.

GONÇALVES, L.S. **Expansão da apicultura brasileira e suas perspectivas em relação ao mercado apícola internacional**. Anais do XV Congresso Brasileiro de Apicultura- Natal-RN, 2004.

GPUIM n°01, Novembro 2011, **Artrite Reumatóide**, disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/b33bbe804a2cce45b864b9aa19e2217c/Boletim_GPUIM_n_01_nov_2011_Artrite_reumatoide.pdf?MOD=AJPERE
S. Acesso em 26 de Abril de 2013.

GRAMACHO, K. P; MALASPINA, O; PALMA, M. S;**Avaliação da produtividade de veneno em abelhas africanizadas pela utilização da técnica de coleta por estimulação elétrica**.Naturalia, v.1, p.265, 1992.

HERNÁNDEZ, R. V;**Aspectos toxinológicos y biomédicos del veneno de lasabejas Apis mellifera**. Iatreia, v. 16, n. 3, p. 217-227, 2003.

HIDER, R. C. **HONEYBEE VENOM: A rich source of pharmacologically active peptides**.Endeavour, v. 12, n. 2, p. 60-65, 1988.

IMAGEJ, Internet site address: <http://rsb.info.nih.gov/ij/> acessadoem 02/07/2015

IONETE, R. X; DINCA O. R; TAMAIA R; GEANA I. E; **Exploring Apis mellifera Venon Compounds Using Highly Efficient Methods, National Institute for research and development for cryogenics and isotopic Technologies** – ICIT rm. RamnicuValcea, Romania Volume 16, capitulo 2, 2013.

LACHMAN, L; DELUCCA, P. AKERS, M.J, **Testes de estabilidade e fundamentos de cinética química**. In; LACHMAN, L. LIEBERMAN H. A.; KANIG, J.L. **Teoria e pratica na indústria farmacêutica**. Lisboa: Fundação CalousteGulbenKian, v. 2, cap 256. 2001

LEANDRO, L.F. *et al*; **Antimicrobial activity of apitoxin, melittin and phospholipase A₂ of honeybee (*Apis mellifera*) venom against oral pathogens**, Laboratório de Pesquisas em Microbiologia Aplicada (LaPeMA), Universidade de Franca, Av. Dr. Armando Salles Oliveira, 201, Bairro Parque Universitário, 14404-600 Franca, SP, Brasil.

LEITE G. L; ROCHA S. L; **Apitoxina** - Montes Claros, v.7, n.1 - jan./jun. 2005.

MAIA A.B, **O Potencial Terapêutico da Apitoxina**, 2012. disponível em: <http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/66/apitoxina.htm>
Acessado em 20/01/2014.

MEYER, B.N.; FERRIGINI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D.E; McLAUGHLIN, J. L. Brine Shrimp: **A convenient general bioassay for active plant constituents**. Planta MEDICA, V.45, N.30, P. 31-34, 1982

MICHENER, C. D; **The bees of the world**. 2 ed. United States of America: The Johns Hopkins, 2000.

MOREIRA, D.R; **Apiterapia no tratamento de patologias**. 2012. Revista F@ciência, Apucarana-PR, ISSN 1984-2333, v.9, n. 4, p. 21 – 29, 2012.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1997. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard M2- A6**. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.

NOGUEIRA-COUTO, R. H.; COUTO, L. A; **Apicultura: manejo e produtos**. Editora Jaboticabal: FUNEP, 2002.

NUNES, B. S; CARVALHO F. D; GUILHERMINO L. M; STAPPEN G. V; **Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing**. Environmental pollution, v. 144 , p. 453-462, 2006.

OLIVEIRA, M. E. C.; PODEROSO, J. C. M.; FERREIRA, A. F.; RIBEIRO, G. T.; ARAÚJO, E.D.; **Apicultores do Estado de Sergipe**, Brasil. Scientia Plena, v. 6, n. 1, p. 1-7, 2010.

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 Brazilian Journal of Pharmacognosy 18(2): 301-307, Abr./Jun. 2008

OKOLI A. S, IROEGBU C. U; **Avaliação de extratos de Anthocleista Djalonensis, Nauclea Latifolia e Uvaria Afzalii para actividade contra bactérias isoladas de casos de uretrite não gonocócica**. J. Etnofarmacologia. 2004;92:135-144.

ORŠOLIĆ, N.. **Bee venom in cancer therapy**. Cancer Metastasis Reviews, v.31, n.1-2, p.173-194, 2011.

OWEN, M. D.; PFAFF, L. A. **Melittin synthesis in the venom system of the honey bee (*Apis mellifera* L.)**. Toxicon. 33, 1181-8, 1995.

PARRA, A. L; SILVA, Y.R; GUERRA, G. I; IGLESIAS, B. L; **comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and estimate of the médiumlethal dose in mice, to determine oral acute toxicity of plants extracts**. Phytomedicine, v.8, n.5, p 359-400, 2001

PINTO T. J. A, KANEKO T. M, OHARA M. T; **Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos**. 2.ed. São Paulo: Atheneu Editora, 325 p, 2003.

PINTO, M.C, **Formas farmacêuticas tópicas contendo nanopartículas lipídicas**, 2010. URL: <http://hdl.handle.net/10284/160>.

PIRANI J.R; LAURINDO M. C; **Flores e Abelhas em São Paulo – São Paulo**, Edusp e FAPESP, 1993.

Projeto Ciclo, disponível em:

<http://projetoecociclo.blogspot.com.br/2009/08/anatomia-da-abelha.html>

RECHIA, M.L.; **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de gel a base de extrato de *Melissa officinalis*L**, UFSC Florianópolis 2010.

ROAT, T. C.; NOCELLI, R. C. F.; LANDIM, C. C. **The venom gland of queens of *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae): morphology and secretory cycle**. *Micron*, v. 37, n. 8, p.717-723, 2006.

SAHPAZ S; BORIES C; LOISEA U.P. M; CORTES D; HOCQUEMILLER R; LAURENS A; CAVE A; **Atividade citotóxica e antiparasitária a partir de sementes de *Annona senegalensis***. *Planta Med.* 1994;60:538-540.

SASVARY, T; MUELLER, U (1994) **Deaths from insect stings in Switzerland 1978-1987** 1397. *Schweizerische Medizinische Wochenschrift* 124 (43): 1887-1984.

SILVA, E. ; Apicultura sustentável: **Produção e comercialização de mel no sertão Sergipano**. (Dissertação de mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde). Universidade Federal de Sergipe - UFS, Aracaju, SE, Brasil, 2010.

SILVA, J.A.*et al.* **Estudo de liberação e permeação *in vitro* do diclofenaco de dietilamônio em microemulsão gel-like**. *Química nova* vol. 32nº 06 São Paulo, 2009.

SILVA, J.A.*et al.* **Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas**. *Revista Ciências Farmacéuticas Básica Aplicada*, 2010;31(3):125-131

SIMICS, M. **Symptoms of honeybee venom**. Richmond: Apitherapy Education Service, 2000. 40p.

SIMONSEN, L; PETERSEN, M.B; GROTH, L;**In vivo skin penetration of salicylic compounds in hairless rats**.EuropeanJournalofPharmaceuticalSciences 2002 (17): 95-104.

SIQUEIRA JM, BOMM MD, PERRAIRA NFG, GARCEZ WS, BOAVENTURA MAD. **Estudo fotoquímico de Unopopsis lindmanii Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio em *Artemia salina* Leach**. Química nova. 1998;21(5):557-559.

SOUZA, L. M. **Modelagem por Homologia de Estruturas Protéicas do Veneno de *Apis mellifera***. 2008. Disponível em:

http://www.ffclrp.usp.br/dfm/tcc/2008/Monografia_Mariana_Laureano.pdf>.

Acesso em: 26 de abril de 2013

STULZER, H. K; GONÇALVES, R. M; FERREIRA, M. P;**Loção infantil para assaduras**. Cosmetics & Toiletries (Edição em Português), v. 18, p. 90-93, mar./abr. 2006.

SWART H; BREYTEBBACH J.C; HADGRAFT J; PLESSIS J;**Synthesis and transdermal penetration of NSAID glycoside esters**. Int J Pharm. 2005; 301(1-2):71-9.

TEICHMANN A; HEUSCHKELS; JACOBI U; PRESSE G; NEUBERT RHH; STERRY W; LADEMANN J;**Comparison of stratum corneum penetration and localization of a lipophilic model drug applied in an o/w microemulsion and an amphiphilic cream**. European Journal Pharmacy Biopharm. 2007; 67(3):699-706

TILL, S.J; FRANCIS, J.N; NOURI-ARIA, K; DURHAM, S.R;**Molecular mechanisms in allergy and clinical immunology**. Journal of Allergy and Clinical Immunology, v.113, n.6, p.1025-1034

VIDAL, M.F;**Efeitos da seca em 2012 sobre a apicultura nordestina**. Informe Rural Etene, ano VII, n.2, 2013.

VILEGAS W; CARDOSO C. A. L. 2007. **Controle químico de qualidade de fitoterápicos e plantas medicinais**. In: Yunes RA, Cechinel Filho V. *Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia*. 1 ed. Itajaí: Univali.

KERR, W. E; **The history of the introduction of African bees to Brazil**. South African Bee Journal, Petroria, África do Sul, v. 39, p. 3-5, 1967 Disponível em: <http://www.ebah.com.br/content/ABAAAAmw0AB/apitoxina?part=3> Acessado em 10/02/2014.

WHO - World Health Organization 1998. **Quality control methods for medicinal plant materials**. Geneva.

WINSTON, M. L; **The biology of the honey bee**. 1987.281p

WINSTON, M. L; **The Africanized “Killer” bee: biology and public health**. The Quarterly Journal of Medicine, v. 87, n. 5, p. 263-267, 1994.

WOKOVICH, A. M; PRODDUTURI, S.; DOUB, W. H; HUSSAIN, A.S.; BUHSE, L .F; **Transdermal drug delivery system (TDDS) adhesion as a critical safety, efficacy and quality attribute**. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics
2006

ZANIN S.M.W *et al*; **Parâmetros Físicos no estudo da estabilidade das Emulsões**, Revista Visão Acadêmica, Curitiba, v. 2, n. 2, p. 47-58, Jul.-Dez./2001.