

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

**ANNA CAROLINA CANTARELLI
JOSÉ RICARDO GASPAR CABRERA FILHO**

**DESENVOLVIMENTO E ESTUDO DE ESTABILIDADE DE POMADA CONTENDO
EXTRATO DE PRÓPOLIS VERMELHA**

PONTA GROSSA

2024

**ANNA CAROLINA CANTARELLI
JOSÉ RICARDO GASPAR CABRERA FILHO**

**DESENVOLVIMENTO E ESTUDO DE ESTABILIDADE DE POMADA CONTENDO
EXTRATO DE PRÓPOLIS VERMELHA**

Development and stability study of ointment containing red propolis extract

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

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

PONTA GROSSA

2024



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

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

ANNA CAROLINA CANTARELLI
JOSÉ RICARDO GASPAR CABRERA FILHO

**DESENVOLVIMENTO E ESTUDO DE ESTABILIDADE DE POMADA CONTENDO
EXTRATO DE PRÓPOLIS VERMELHA**

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

Data de aprovação: 11/dezembro/2024

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

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

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

PONTA GROSSA

2024

AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos nossos pais, por todo esforço destinado a nos proporcionar as melhores oportunidades de estudo e educação.

Agradecemos à nossa orientadora, Prof. Dr. Maria Carolina Oliveira Ribeiro, por todas as oportunidades criadas e por todo conhecimento compartilhado.

À Emanuelle Naumann, por todo apoio e suporte recebido.

Aos nossos colegas de universidade, laboratório e pesquisa, Nayara, Alexsandro, Maria Fernanda, Ana Carolina, Ana Clara, Luan, João, Leonara e Ludmila, que de forma direta ou indireta, contribuíram com este trabalho.

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) e à Pró-reitoria de Relações Empresariais e Comunitárias (PROREC), pela concessão de bolsa de apoio por meio do edital de “TCC Inovação” para o desenvolvimento deste trabalho.

"Não se teria jamais atingido o possível,
se não se houvesse tentado o impossível."
(WEBER, Max).

RESUMO

A própolis vermelha é um produto apícola e seu potencial terapêutico tem despertado interesse crescente na comunidade científica e na indústria farmacêutica devido a sua composição química única e dotada de bioativos que podem ser explorados como uma alternativa natural e eficaz aos medicamentos tradicionais. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver pomada adicionada de extrato de própolis vermelha e avaliar o desempenho da formulação desenvolvida por meio de estudos de estabilidade (centrifugação, preliminar e acelerada). A matriz cosmética adotada foi a formulação adaptada de Barros *et al.* (2010) e foram formuladas pomadas com 3% e 5% de ativo (que corresponde as concentrações finais de 2,1 mg/mL e 3,5 mg/mL de própolis vermelha). Ambas as pomadas permaneceram estáveis durante o teste de centrifugação. Durante o teste preliminar houve separação de fases na pomada de 5%. Por isso, apenas a pomada de 3% foi conduzida para o teste de estabilidade acelerada e obteve resultados positivos quanto a manutenção do pH e as características organolépticas, sem separação de fases e foi encaminhada ao teste de estabilidade acelerada. Durante o teste de estabilidade acelerada, a maioria das pomadas de 3% manteve suas características organolépticas e de pH (entre 5,5 a 7,5), com exceção das pomadas submetidas a condição de luminosidade (C1 e A1), que apresentaram pH abaixo de 5,5 e alterações de aspecto e cor. Não foi possível avaliar microbiologicamente devido a erro de procedimento experimental e por isso, apesar dos demais resultados positivos, a pomada de 3% de EPV não pode ser considerada estável. Concluiu-se que devido ao erro de procedimento experimental durante os testes microbiológicos, o ideal seria refazer o teste de estabilidade acelerada para ter resultados mais robustos a respeito da estabilidade deste extrato.

Palavras-chave: própolis; própolis vermelha; pomada; testes de estabilidade.

ABSTRACT

Red propolis is a bee product and its therapeutic potential has aroused increasing interest in the scientific community and the pharmaceutical industry due to its unique chemical composition and bioactives that can be explored as a natural and effective alternative to traditional medicines. Therefore, the objective of this study was to develop an ointment with red propolis extract and evaluate the performance of the developed formulation through stability studies (centrifugation, preliminary and accelerated). The cosmetic matrix adopted was the formulation adapted from Barros et al. (2010) and ointments with 3% and 5% of active ingredient were formulated (corresponding to final concentrations of 2.1 mg/mL and 3.5 mg/mL of red propolis). Both ointments remained stable during the centrifugation test. During the preliminary test, there was phase separation in the 5% ointment. Therefore, only the 3% ointment was submitted to the accelerated stability test and obtained positive results regarding maintenance of pH and organoleptic characteristics, without phase separation, and was sent to the accelerated stability test. During the accelerated stability test, most of the 3% ointments maintained their organoleptic and pH characteristics (between 5.5 and 7.5), with the exception of the ointments submitted to light conditions (C1 and A1), which presented pH below 5.5 and changes in appearance and color. It was not possible to evaluate microbiologically due to an error in the experimental procedure and therefore, despite the other positive results, the 3% EPV ointment cannot be considered stable. It was concluded that due to the error in the experimental procedure during the microbiological tests, the ideal would be to redo the accelerated stability test to have more robust results regarding the stability of this extract.

Keywords: propolis; red propolis; ointment; stability tests.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição de diferentes tipos de própolis no Brasil	17
Figura 2 - (a) Própolis vermelha (b) Planta de <i>Dalbergia ecastophyllum</i>	19
Figura 3 - Fluxograma da obtenção do extrato de própolis vermelha.....	23
Figura 4 - Equipamento para análise de espalhabilidade	26
Gráfico 1 - Espalhabilidade das pomadas controle	33
Gráfico 2 - Espalhabilidade das pomadas 3% EPV	33

LISTA DE FOTOGRAFIAS

Fotografia 1 - Formulações sem EPV (a esquerda) e com EPV (à direita)	29
Fotografia 2 - Controle, Amostra 1 (3%) e Amostra 2 (5%) após formulação	30
Fotografia 3 - Comparativo de aspecto de controle e amostra submetidos a luminosidade (condição 1) no 15º dia e no 30º dia.....	32
Fotografia 4 - Teste de espalhabilidade de controle e amostra	34

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação das própolis brasileiras	18
Quadro 2 - Parâmetros comuns na avaliação da estabilidade	22
Quadro 3 - Parâmetros para análise das características organolépticas	25
Quadro 4 - Periodicidade planejada para o teste de estabilidade acelerada	28
Quadro 5 - Análises organolépticas por ciclo por amostra.....	30
Quadro 6 - Análises organolépticas por ciclo por amostra.....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Formulação pomada base.....	24
Tabela 2 - pH médio durante o teste preliminar por ciclo por amostra	30
Tabela 3 - pH médio por amostra.....	31
Tabela 4 - Espalhabilidade ($\text{cm}^2.\text{g}^{-1}$) das amostras de acordo com a equação (1)	32
Tabela 5 - Contagem microbiológica do 1º e 91º dia (UFC/mL).....	35

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	15
2.1	Objetivo geral.....	15
2.2	Objetivos específicos.....	15
3	REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1	Própolis	16
3.2	Própolis vermelha	18
3.3	Obtenção de extratos.....	19
3.4	Pomadas e Testes de Estabilidade	20
4	METODOLOGIA	23
4.1	Obtenção do extrato de própolis vermelha (EPV)	23
4.2	Formulação da pomada base para extrato de própolis vermelha....	23
4.3	Teste de centrifugação	24
4.4	Parâmetros para testes preliminares e de estabilidade acelerada ..	25
4.4.1	Análises organolépticas	25
4.4.2	Análises de pH.....	25
4.4.3	Análises de espalhabilidade.....	26
4.4.4	Análises microbiológicas ou de contagem microbiana	26
4.5	Teste de estabilidade preliminar	27
4.6	Teste de estabilidade acelerada.....	28
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	29
5.1	Teste de centrifugação	29
5.2	Teste de estabilidade preliminar	29
5.3	Teste de estabilidade acelerada.....	30
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	37
	REFERÊNCIAS.....	38

1 INTRODUÇÃO

A própolis é constituída por uma substância resinosa e balsâmica, que as abelhas recolhem de diversas partes das plantas presentes em sua região geográfica. Este composto complexo é enriquecido na colmeia com secreções salivares das abelhas. Elas utilizam esta resina para proteger a colmeia, atuando como uma barreira contra a proliferação de microrganismos, incluindo fungos e bactérias. Além de sua função defensiva, a própolis tem sido estudada por suas propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias e antioxidantes, sendo também utilizada em produtos de saúde e cosméticos devido a seus benefícios potenciais (SILVA *et al.*, 2006).

A própolis começou a ser valorizada como substância para tratamento médico nas décadas de 1950 e 1960 na União Soviética e Europa Oriental, sendo utilizada para diversas doenças com bons resultados. No Ocidente e no Japão, sua popularidade só cresceu a partir dos anos 1980, quando foi anunciada como uma possibilidade promissora em farmacologia no Congresso Internacional de Apicultura em Nagoya (1985). Anteriormente considerado um subproduto sem valor pelos apicultores, a própolis ganhou importância na medicina alternativa. Hoje, o Japão é o maior importador da própolis do Brasil, preferindo o produto brasileiro (SALATINO *et al.*, 2005).

No Brasil, existem três tipos de própolis mais relevantes: a verde, derivada da resina do alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*), planta nativa do cerrado; a vermelha, produzida a partir da planta rabo-de-bugio (*Dalbergia ecastophyllum*), encontrada no Nordeste; e a marrom, ou tradicional, que não requer uma planta específica para sua produção (BERRETA *et al.*, 2017).

A própolis vermelha brasileira tem ganhado destaque comercial devido à sua riqueza de compostos bioativos e efeitos farmacêuticos. Nos últimos anos, houve um crescimento na exportação dessa própolis e no número de pesquisas científicas dedicadas a ela (NUNES *et al.*, 2008). Pesquisadores nacionais e internacionais têm demonstrado um crescente interesse na composição e nas propriedades desta substância, atraindo atenção de especialistas de diversos países, incluindo Japão e Cuba. Este interesse global destaca a relevância e o potencial das pesquisas realizadas, promovendo colaborações internacionais e avanços científicos na utilização da própolis (LI *et al.*, 2008; PICCINELI *et al.*, 2011).

A própolis vermelha destaca-se por suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes superiores, atribuídas aos compostos químicos exclusivos não presentes em outros tipos de própolis (FRANÇA *et al.*, 2020). Essas propriedades são atribuídas principalmente à presença de uma maior variedade de flavonoides nas própolis vermelhas. Esses compostos conferem ao produto características cicatrizantes e anti-inflamatórias, aumentando seu valor terapêutico (SILVA, 2018).

Isso torna interessante a utilização de um extrato de própolis vermelha em uma base de dimetilsulfóxido para intensificar suas propriedades farmacológicas, visto que o DMSO, quando utilizado como carreador de substâncias medicamentosas é capaz de contribuir com seus efeitos, já que possui acentuada capacidade de penetração, ação anti-inflamatória e ação analgésica (TORRES *et al.*, 2021). Utilizando soluções extrativas como tinturas de extratos hidroalcoólicos, glicólicos ou hidroglicólicos, esses princípios ativos podem ser incorporados em formas farmacêuticas tópicas, como pomadas (BORELLA *et al.*, 2010). O uso de uma pomada como método de transporte do princípio ativo facilita a aplicação no local do tratamento, e suas características permitem atravessar a barreira da pele (FARMACOPEIA PORTUGUESA, 2008).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver uma pomada estável contendo extrato de própolis vermelha.

2.2 Objetivos específicos

- Obter o extrato de própolis vermelha em DMSO a 7% (70 mg/mL);
- Desenvolver uma formulação base adequada para veicular o extrato de própolis vermelha;
- Avaliar o desempenho da formulação adicionada de extrato de própolis nas condições do estudo da estabilidade preliminar;
- Avaliar o desempenho da formulação final por meio de testes de estabilidade acelerada.

3 REVISÃO DE LITERATURA

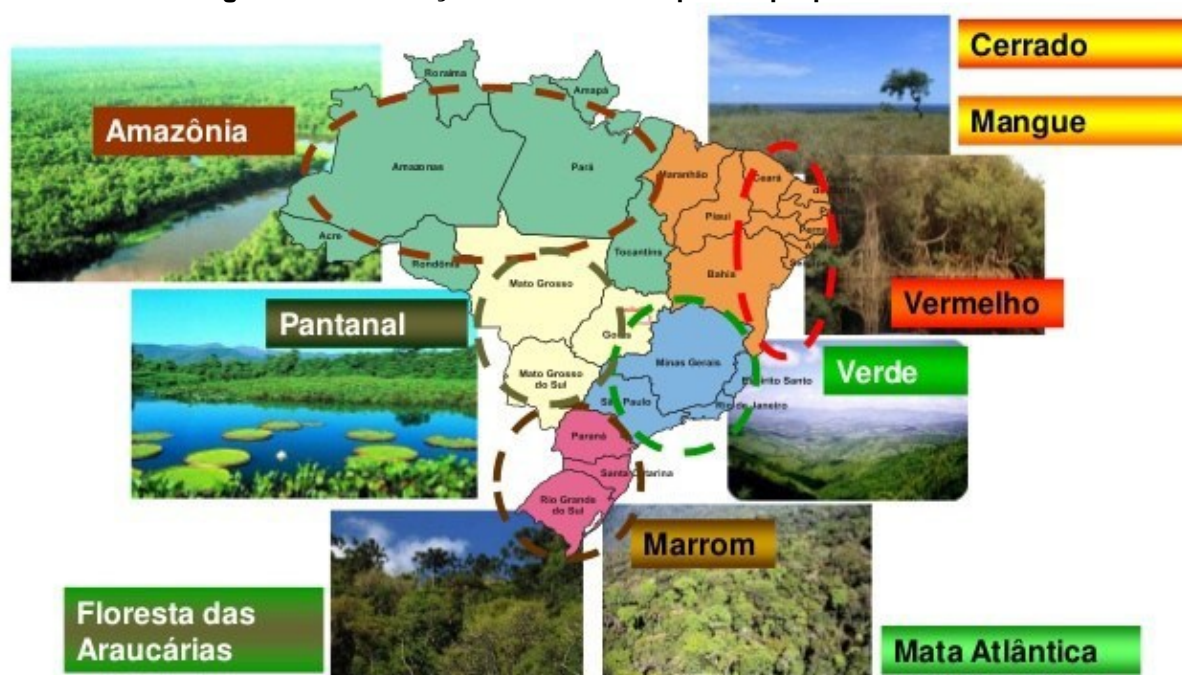
3.1 Própolis

A própolis é amplamente utilizada como fitoterápico devido às suas diversas propriedades medicinais. Ela é eficaz no tratamento de infecções e problemas de pele, estimulando o sistema imunológico e apresentando atividades cicatrizantes e antibióticas, especialmente contra bactérias Gram-positivas. Além disso, a própolis possui ação antisséptica, antifúngica, antipirética, adstringente, anti-inflamatória e anestésica (SILVA *et al.*, 2019). Pesquisas também indicam que a própolis pode ajudar na prevenção de resfriados, acelerar a cicatrização de feridas e queimaduras, e aliviar dores de garganta. Sua composição rica em flavonoides e compostos fenólicos contribui para suas propriedades antioxidantes, que ajudam a combater os radicais livres e proteger o organismo contra o estresse oxidativo (LUSTOSA *et al.*, 2008).

A composição da própolis geralmente inclui resinas e bálsamos vegetais (30-40%), cera de abelha (20-30%), óleos essenciais (5-10%), grãos de pólen (1-5%), outras substâncias orgânicas (1-5%) e detritos como madeira e terra (1-5%). Além disso, contém microelementos como alumínio, cálcio, ferro, estrôncio, cobre e manganês, e vitaminas B1, B2, B6, C e E (SALGUEIRO, 2016). É importante notar que a composição da própolis pode variar significativamente entre diferentes coletas devido à falta de uniformidade. Por exemplo, uma amostra coletada em janeiro, durante a estação chuvosa, pode ser quimicamente distinta de uma amostra coletada na mesma região em maio (OLIVEIRA, 2023).

A cor e a composição química da própolis variam conforme sua origem geográfica, apresentando tonalidades que vão de marrom escuro com traços esverdeados a marrom-avermelhado (ANDRADE *et al.*, 2017). Os flavonoides e ácidos fenólicos, compostos bioativos fundamentais na própolis, são encontrados em quantidades diversas, influenciadas pelas condições climáticas e geográficas específicas (LIMA, 2024). A distribuição das diferentes própolis no Brasil está representada abaixo (Figura 1).

Figura 1 - Distribuição de diferentes tipos de própolis no Brasil



Fonte: ABEMEL (2017)

A própolis marrom do sul do Brasil se destaca por conter ácidos cafeoilquínicos, derivados de ácido p-cumárico, flavonóis e dihidroflavonóis em concentrações específicas (MACHADO *et al.*, 2021). Em contraste, a própolis verde é notável pela predominância de triterpenóides como α -e β -amirinas e seus acetatos, ácidos cinâmicos prenilados e ácidos cafeoilquínicos, com teores relativamente baixos de flavonoides. Por fim, a própolis vermelha do nordeste brasileiro apresenta uma composição rica em pterocarpanos, isoflavonoides, chalconas e fenilpropanóides, com compostos voláteis como trans-anetol, copaeno e metil-cis-isoeugenol contribuindo para suas propriedades antibacterianas e anti-inflamatórias (FERREIRA e NEGRI, 2018). O Quadro 1 traz a classificação das própolis brasileiras segundo a faculdade de engenharia de alimentos da Universidade Estadual de Campinas.

Quadro 1 - Classificação das própolis brasileiras

Grupo	Cor	Região	Origem botânica
01	Amarelo	Sul (RS)	<i>Myrceugenia eurosma (Myrtaceae)</i>
02	Castanho claro	Sul (RS)	<i>Myrceugenia eurosma (Myrtaceae)</i>
03	Castanho escuro	Sul (RS)	<i>Myrceugenia eurosma (Myrtaceae)</i>
04	Castanho claro	Sul (RS)	<i>Myrceugenia eurosma (Myrtaceae)</i>
05	Marrom esverdeado	Sul (RS)	<i>Choupos (Populus sp)</i>
06	Marrom avermelhado	Nordeste (BA)	<i>Hyptis divaricata</i>
07	Marrom esverdeado	Nordeste (BA)	-
08	Castanho escuro	Nordeste (PE)	-
09	Amarelo	Nordeste (PE)	-
10	Amarelo escuro	Nordeste (CE)	-
11	Amarelo	Nordeste (PI)	-
12	Verde ou marrom esverdeado	Sudeste (SP)	<i>Baccharis dracunculifolia</i>
13	Vermelha	Nordeste (AL)	<i>Dalbergia ecastophyllum</i>

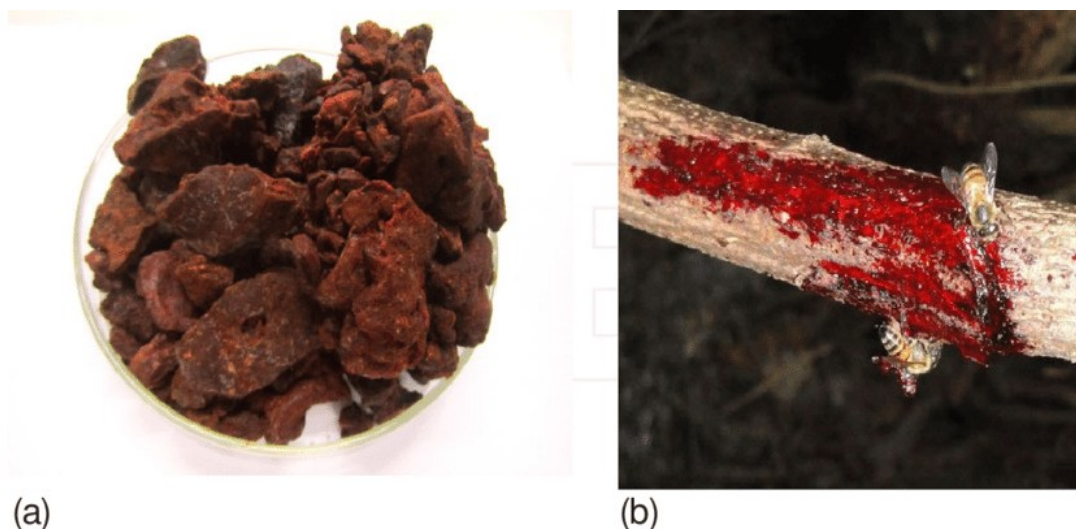
Fonte: De Albuquerque (2021)

3.2 Própolis vermelha

A própolis vermelha tem um maior valor agregado devido a sua origem nos manguezais, fator que dificulta sua colheita. Uma de suas linhagens mais famosas é coletada pelas abelhas *Apis mellifera* das resinas da planta *Dalbergia ecastophyllum*, conhecida como "Rabo de Bugio" (SEBRAE, 2022). Os primeiros estudos sobre este tipo específico de própolis foram conduzidos em Alagoas, onde a produção se consolidou e recebeu um selo de indicação geográfica. No entanto, outros estados brasileiros, como a Bahia, também têm uma produção significativa de própolis vermelha. Além disso, estados como Rio Grande do Norte, Pernambuco, Sergipe e Paraíba estão iniciando sua produção neste segmento (LIMA, 2024).

Essa variedade se distingue pela sua cor avermelhada (Figura 2), atribuída aos compostos fenólicos, especialmente isoflavonoides, que conferem propriedades antioxidantes e antimicrobianas mais potentes em comparação com outros tipos de própolis (SILVA *et al.*, 2008). Outra diferença significativa reside na presença de biomarcadores em sua composição química, tais como biochanina A, daidzeína, quercetina e naringenina (ANDRADE *et al.*, 2017). Esses e outros compostos são responsáveis por vários efeitos benéficos, como propriedades antibacterianas e anti-inflamatórias (DE MENDONÇA *et al.*, 2015).

Figura 2 - (a) Própolis vermelha (b) Planta de *Dalbergia ecastophyllum*



Fonte: Arquivo pessoal de Vagner Santos (2012)

A própolis vermelha brasileira demonstrou significativa atividade antimicrobiana, especialmente contra bactérias gram-positivas como *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.*, *Candida sp.*, *Cryptococcus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Streptococcus sp.*, *Neisseria meningitidis* e *Haemophilus influenzae* (DE PAULA; IZIDORO; RIBEIRO, 2022). Estudos revelaram que essa própolis apresenta concentrações inibitórias mínimas menores contra bactérias gram-positivas em comparação às gram-negativas, o que pode ser atribuído às diferenças na composição estrutural de suas paredes celulares (ARAÚJO *et al.*, 2010).

A própolis vermelha também demonstrou eficácia significativa em testes de capacidade antioxidante e cicatrização *in vitro*, acelerando o fechamento de feridas e mostrando-se não alergênica (BASÍLIO, 2018). Além disso, sua capacidade cicatrizante foi comprovada em estudos utilizando dorso de ratos, comparável ao efeito do padrão D-Pantenol (GALINDO, 2007).

3.3 Obtenção de extratos

Extratos são “preparações de consistência líquida, semissólida ou sólida, obtidas a partir de drogas vegetais, utilizando-se métodos extrativos e solventes apropriados” (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2019). A formulação de um extrato pode se utilizar várias misturas distintas. Os extratos glicerinados são obtidos por maceração de material vegetal em uma mistura solvente de água e glicerina. Por outro

lado, os extratos glicólicos são obtidos utilizando uma mistura solvente de água e glicol. (HEIDARI-SURESHJANI *et al.*, 2015). Outra opção comum para extratos de própolis é o de base hidroalcóolica, que utiliza uma mistura de água e álcool como solvente (DA SILVA, 2023).

A utilização do dimetilsulfóxido (DMSO) como solvente se deve a sua vasta gama de ações farmacológicas, conforme documentado em estudos laboratoriais. Suas funções incluem transporte de membranas, efeitos no tecido conjuntivo, anti-inflamação, analgesia, bacteriostase, diurese, modulação da eficácia de outros medicamentos, inibição da colinesterase, aumento da resistência a infecções, vasodilatação, relaxamento muscular, antagonismo à agregação plaquetária e regulação do colesterol em casos experimentais de hipercolesterolemia (JACOB e HERSCHLER, 1986).

Pela sua capacidade de penetração, o dimetilsulfóxido aumenta a taxa de absorção de alguns compostos através de tecidos orgânicos, incluindo a pele, e por isso é frequentemente utilizado para facilitar o transporte de substâncias associadas a ele (ORLATO, 2006).

3.4 Pomadas e Testes de Estabilidade

A Farmacopeia Brasileira (2019) define pomada como “forma farmacêutica semissólida, para aplicação na pele ou em membranas mucosas, que consiste da solução ou dispersão de um ou mais princípios ativos em baixas proporções em uma base adequada usualmente não aquosa”.

A pomada de base lanolina anidra e vaselina pode ser considerada uma base de absorção, por possuir a capacidade de absorver água adicional. Esta formulação também possui característica oleosa e tem a capacidade emulsionante (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2019).

O uso de pomadas como veículo para o extrato de própolis se deve à sua natureza gordurosa, formando uma camada espessa que protege a pele contra agentes agressivos como sujeira (ALLEN JR *et al.*, 2013). Essa característica, aliada à sua capacidade de hidratar e penetrar na derme, a torna uma base essencial para tratamentos que utilizam as propriedades do extrato (FARMACOPEIA PORTUGUESA, 2008).

Para compreender o comportamento do extrato da própolis vermelha na formulação pretendida é necessário que sejam realizados estudos de estabilidade.

“Art. 8º A estabilidade de um insumo farmacêutico ativo deve ser determinada antes de sua comercialização e repetida após quaisquer mudanças significativas nos processos de produção” (RDC Nº 45, 2012).

A estabilidade refere-se ao tempo em que uma formulação mantém sua quantidade e composição química intactas. Testes de estabilidade são fundamentais para garantir segurança, qualidade e eficácia, oferecendo informações desde a fabricação até o prazo de validade, incluindo recomendações sobre uso, embalagens e condições de armazenamento (ANVISA, 2004).

Os produtos são submetidos às condições que aceleram possíveis alterações durante seu prazo de validade, o que permite identificar e descartar formulações inadequadas. A avaliação da estabilidade das formas farmacêuticas pode ser realizada por meio de testes de estabilidade preliminares, ciclos de temperatura, estabilidade acelerada e testes de estabilidade de longa duração (LUCENA; MENDES; BRANDEBURGO, 2009).

O estudo de estabilidade preliminar é realizado na fase inicial do desenvolvimento de um produto, utilizando diferentes formulações em um período de tempo reduzido. Este teste aplica condições extremas de temperatura para acelerar potenciais reações entre os componentes do produto e identificar sinais que precisam ser observados e analisados conforme as características específicas de cada tipo de produto. Devido às condições rigorosas em que é realizado, o objetivo deste estudo não é estimar a vida útil do produto, mas sim ajudar na seleção das formulações mais promissoras (ANVISA, 2020). É uma etapa crucial para identificar possíveis problemas e otimizar a composição antes de avançar para testes mais extensivos.

Os testes de estabilidade acelerada (estabilidade normal ou exploratória), têm como objetivo fornecer dados para prever a estabilidade do produto, tempo de vida útil e compatibilidade da formulação com o material de acondicionamento. Empregam geralmente condições menos extremas que o teste anterior e servem também para quando houverem mudanças significativas em ingredientes do produto e ou do processo de fabricação ou para validar novos equipamentos ou fabricação por terceiros (ANVISA, 2020).

Os parâmetros escolhidos para serem avaliados podem variar de uma formulação para outra, uma vez que devem ser definidos pelo formulador de acordo com o que se pretende alcançar com o estudo. Os parâmetros mais comuns são descritos no quadro abaixo:

Quadro 2 - Parâmetros comuns na avaliação da estabilidade

Parâmetros	Descrição
Organolépticos	Aspecto, cor, odor e sabor, quando aplicável;
Físico-químicos	Valor de pH, viscosidade, densidade, e em alguns casos, o monitoramento de ingredientes da formulação;
Microbiológicos	Contagem microbiana e teste de desafio do sistema conservante (<i>Challenge Test</i>).

Fonte: Anvisa (2020)

A estabilidade de um produto é uma característica relativa, variando ao longo do tempo e influenciada por fatores que podem acelerar ou retardar mudanças nos seus parâmetros. Modificações dentro de limites determinados não necessariamente resultam na reprovação do produto (ANVISA, 2020).

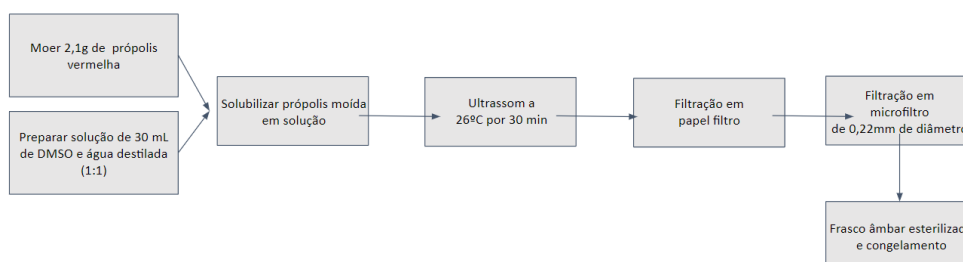
4 METODOLOGIA

4.1 Obtenção do extrato de própolis vermelha (EPV)

A amostra de própolis vermelha utilizada no estudo é originária da região Nordeste do Brasil, do estado de Alagoas, e foi adquirida por comércio eletrônico. A obtenção do extrato de própolis vermelha foi realizada no laboratório de Microbiologia (C006) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) - campus Ponta Grossa.

Para a obtenção do extrato a 7% (70 mg/mL), foram solubilizadas 2,1 g de própolis vermelha moída em 30 mL de uma solução composta por dimetilsulfóxido (DMSO) e água destilada na proporção de 1:1. A amostra foi submetida ao banho ultrassom à temperatura de 26 °C por 30 minutos. Em seguida, foi realizada a filtração da amostra em papel filtro e posteriormente uma nova filtração utilizando microfiltro com membrana de Nylon® de 0,22 µm de diâmetro. Feito isso, o extrato foi transferido para um frasco âmbar esterilizado e mantido sob congelamento (Figura 3).

Figura 3 - Fluxograma da obtenção do extrato de própolis vermelha



Fonte: Autoria própria (2024)

4.2 Formulação da pomada base para extrato de própolis vermelha

Para a pomada base foi adaptada a formulação proposta por Barros *et al.* (2010), contendo as matérias-primas e suas concentrações apresentadas na Tabela 1. O EPV foi adicionado na formulação base como o bioativo nas proporções de 3 e 5% (resultando nas concentrações finais de 2,1 mg/mL e 3,5 mg/mL de própolis vermelha).

Tabela 1 - Formulação pomada base

Fase	Ingrediente	Quantidade (%)
Fase 1 (oleosa)	Lanette N (álcool cetoestearílico + cetil estearil sulfato de sódio)	15%
Fase 1 (oleosa)	Lanolina anidra	45%
Fase 1 (oleosa)	Vaselina sólida	20%
Fase 1 (oleosa)	Propilparabeno	0,15%
Fase 1 (oleosa)	Butilhidroxitolueno (BHT)	0,1%
Fase 2 (aquosa)	Metilparabeno	0,05%
Fase 2 (aquosa)	Água destilada	q.s.p 100%
Fase 3 (extrato)	Polissorbato 20 (Tween 20)	5,5%
Fase 3 (extrato)	Extrato de própolis vermelha (EPV)	3% ou 5%

***q.s.p é a abreviação de “quantidade suficiente para”.**

Fonte: Autoria própria (2024)

Para o preparo da pomada base, foram misturados em um béquer os componentes da Fase 1 (oleosa) e em outro béquer foram misturados os componentes da Fase 2 (aquosa). Os componentes da Fase 3 (extrato) foram misturados em um terceiro béquer. Em seguida, aqueceram-se as Fases 1 (oleosa) e 2 (aquosa) a 75°C. Feito isso, verteu-se a fase aquosa sobre a fase oleosa sob agitação moderada para homogeneização e resfriamento da mistura. A Fase 3 (extrato) foi vertida sobre a mistura, a cerca de 40°C, sob agitação leve. Assim que finalizada, a pomada foi armazenada em um recipiente plástico com barreira a luz, próprio para cosméticos.

4.3 Teste de centrifugação

Antes de iniciar os experimentos relacionados à estabilidade do produto, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária recomenda submeter o produto ao teste de centrifugação a 3.000 rpm durante 30 minutos. Ao fim deste teste, o produto deve permanecer estável para que possa ser submetido aos testes sequenciais de estabilidade. Caso seja notada alguma instabilidade na formulação após a centrifugação, será necessário reformular o produto.

4.4 Parâmetros para testes preliminares e de estabilidade acelerada

Os parâmetros adotados para o estudo preliminar foram as análises de cor, odor e aspecto (organolépticas) e pH (físico-químicas). Para o estudo de estabilidade acelerada, foram analisados os parâmetros adotados no teste preliminar com a adição dos testes de espalhabilidade e de contagem microbiológica.

4.4.1 Análises organolépticas

Para as análises das características organolépticas foram adotadas apenas relações qualitativas que possam evidenciar a alteração em maior ou menor grau das amostras. Para a análise de cor, no entanto, foram realizadas apenas análises visuais. As determinações de parâmetros para análises organolépticas sugeridas pela Anvisa (2020) estão representadas no quadro abaixo:

Quadro 3 - Parâmetros para análise das características organolépticas

Parâmetro	Classificação	Metodologia
Aspecto	1 - Normal, sem alteração; 2 - Levemente separado, levemente precipitado ou levemente turvo; 3 - Separado, precipitado ou turvo.	Observam-se visualmente as características da amostra, verificando se ocorreram modificações macroscópicas em relação ao padrão estabelecido. O aspecto pode ser descrito como: granulado, pó seco, pó úmido, cristalino, pasta, gel, fluído, viscoso, volátil, homogêneo, heterogêneo, transparente, opaco, leitoso, etc.
Cor	1 - Normal, sem alteração; 2 - Levemente modificada; 3 - Modificada; 4 - Intensamente modificada.	Vários são os métodos utilizados para a verificação de cor; os mais usuais são os métodos visual e espectrofotométrico. Compara-se a cor da amostra com a do padrão estabelecido, em um frasco de mesma especificação. As fontes de luz empregadas podem ser luz branca, natural ou, ainda, em câmaras especiais com diversos tipos de fontes de luz.
Odor	1 - Normal, sem alteração; 2 - Levemente modificada; 3 - Modificada; 4 - Intensamente modificada.	Compara-se o odor da amostra com a do padrão estabelecido, diretamente através do olfato.

Fonte: Anvisa (2020)

4.4.2 Análises de pH

As análises de pH foram realizadas por meio de uma dispersão aquosa 10% m/m preparada com 0,5 grama de amostra de cada formulação em água destilada. Após aquecimento, foi realizada a homogeneização com o agitador do tipo vórtex e posteriormente a leitura utilizando um pHmetro de bancada. As análises foram realizadas em triplicata.

4.4.3 Análises de espalhabilidade

A determinação da espalhabilidade foi realizada de acordo com Naumann (2023), com a utilização de um equipamento especialmente construído para este fim. O equipamento contou com uma base de madeira, na qual estava fixo o papel milimetrado, e duas placas de vidro. Uma das placas permaneceu sobre a base de madeira com o papel milimetrado, onde foi depositada a amostra. A outra placa, de peso conhecido, foi colocada sobre a amostra. Em intervalos de 2 (dois) minutos, foram adicionados pesos a placa até que se atingisse o peso final de 1000 g sobre a placa de vidro. Após a adição do último peso, foi realizada a leitura dos diâmetros em posições opostas com auxílio do papel milimetrado e então foi calculado o diâmetro médio para aquele peso. Os resultados, em espalhabilidade da amostra em função do peso aplicado, foram encontrados utilizando a equação abaixo:

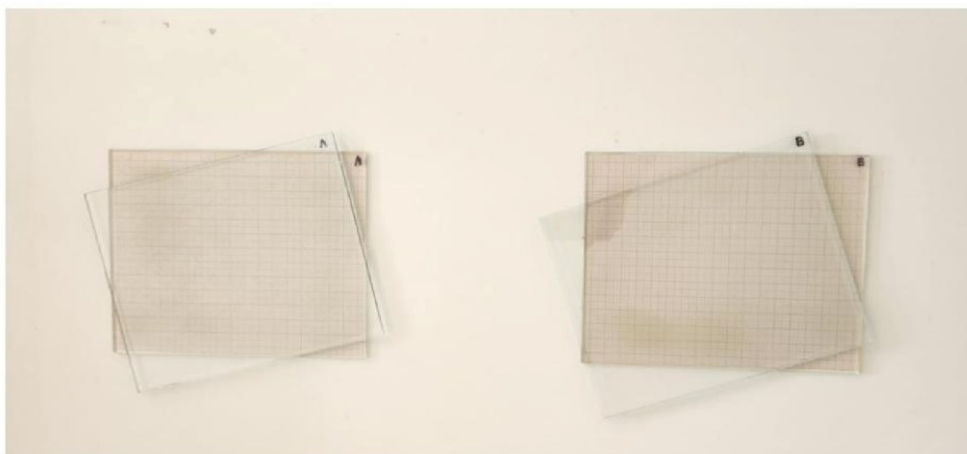
$$Ei = \frac{d^2 \cdot \pi}{4}$$

Onde:

Ei = espalhabilidade da amostra para um determinado peso i (cm²);

d = diâmetro médio (cm).

Figura 4 - Equipamento para análise de espalhabilidade



Fonte: Naumann (2023)

4.4.4 Análises microbiológicas ou de contagem microbiana

As formulações foram submetidas a contagem microbiana em dois momentos distintos, no início (tempo 0) e no fim (dia 91º) do experimento. Para a detecção de contaminação microbiológica foram utilizados meios de cultura específicos, sendo Ágar PCA (*Plate Count Agar*) para bactérias e Ágar Batata Dextrose (BDA) acidificado com ácido tartárico 10% para bolores e leveduras.

Para a contagem de aeróbios mesófilos foi utilizado o procedimento de contagem padrão em placas com semeadura por profundidade (*pour plate*), as placas foram incubadas em estufa a 37°C/48hrs. Para a contagem de bolores e leveduras, foi usada semeadura em superfície (*spread plate*) e as placas incubadas a 28°C/96hrs (SILVA *et al.*, 2017).

Os parâmetros para controle microbiológico que foram adotados para estas análises seguem a Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 630, de 10 de março de 2022 da Anvisa considerando que a pomada base elaborada se enquadra na categoria descrita como “Tipo II”, que engloba demais produtos cosméticos suscetíveis a contaminação microbiológica, que não necessariamente são de uso infantil, destinados a região dos olhos ou entram em contato com mucosas.

4.5 Teste de estabilidade preliminar

O estudo de estabilidade preliminar, também conhecido como Triagem, consiste em submeter diferentes formulações a condições de estresse para acelerar possíveis reações que possam causar instabilidade nas formulações testadas. Essas condições de estresse se apresentam em ciclos alternados de congelamento e descongelamento com análises periódicas de características organolépticas e físico-químicas.

Para a realização deste teste, as amostras foram formuladas e armazenadas em embalagens plásticas em polipropileno homopolímero (PP Homo) na cor branca e de fundo falso, que é resistente a quedas e bloqueia a luminosidade. A formulação seguiu as orientações da Anvisa, que determinam que a quantidade deve ser suficiente para as avaliações e para que se mantenha um espaço vazio (*head space*) seguro para trocas gasosas de um terço do espaço total disponível no frasco.

Além da formulação base adicionada do EPV nas duas concentrações de 3% e 5%, também foram submetidas a este teste uma amostra controle (sem adição do EPV).

As amostras foram formuladas no T0, após 24 horas, foram iniciados os ciclos de congelamento e descongelamento. Ao todo, foram seis ciclos de congelamento ($-10 \pm 2^\circ\text{C}$) e descongelamento em estufa ($45 \pm 2^\circ\text{C}$), com alternância entre essas condições a cada 24 horas, totalizando 13 dias corridos de teste preliminar, as condições propostas corroboram com as diretrizes da Anvisa. A cada ciclo completo (congelamento e descongelamento) foram realizadas análises organolépticas e de pH.

4.6 Teste de estabilidade acelerada

Para este teste, o controle e a amostra com EPV 3% foram acondicionados em embalagens de Polietileno de Alta Densidade (PEAD), transparente para a condição de luminosidade e na cor branca para as demais, respeitando o espaço vazio (*head space*) seguro para trocas gasosas e em quantidade suficiente para as análises que foram realizadas.

Para a realização desse estudo, as amostras foram submetidas a 5 (cinco) condições diferentes, sendo elas:

- 1) sob iluminação;
- 2) temperatura ambiente e escuro;
- 3) refrigerador ($5 \pm 2^\circ \text{C}$);
- 4) estufa ($45 \pm 2^\circ \text{C}$);
- 5) sob movimento.

As análises foram feitas periodicamente e foram avaliadas características organolépticas, pH e espalhabilidade. Ao início e ao fim do teste foram realizadas também análises microbiológicas. O teste foi conduzido conforme exposto no quadro a seguir:

Quadro 4 - Periodicidade planejada para o teste de estabilidade acelerada

Tempo (dias)	Análises
0	Organolépticas, pH, espalhabilidade e microbiológicas
1º	Organolépticas, pH e espalhabilidade
7º	Organolépticas, pH e espalhabilidade
15º	Organolépticas, pH e espalhabilidade
30º	Organolépticas, pH e espalhabilidade
60º	Organolépticas, pH e espalhabilidade
91º	Organolépticas, pH, espalhabilidade e microbiológicas

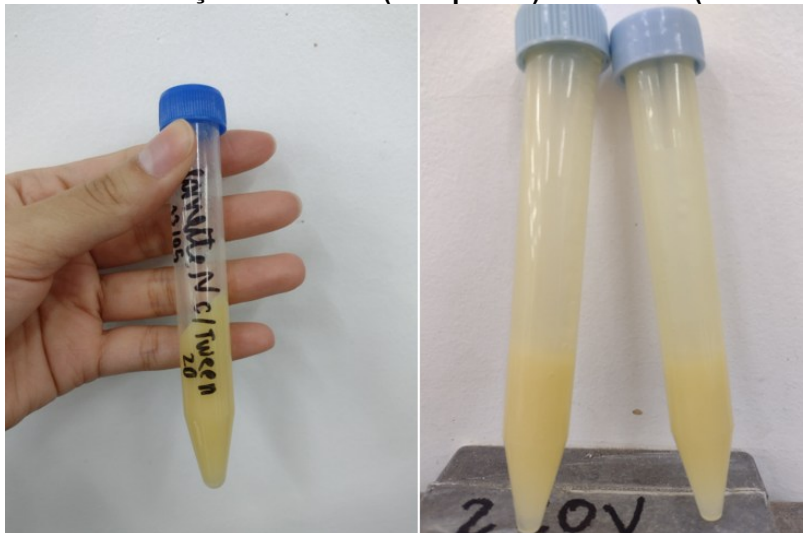
Fonte: Autoria própria (2024)

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Teste de centrifugação

A formulação foi submetida ao teste de centrifugação, a qual se apresentou estável no controle e também com as concentrações de EPV escolhidas (3 e 5%), sendo, portanto, escolhida para prosseguir com os testes de estabilidade.

Fotografia 1 - Formulações sem EPV (à esquerda) e com EPV (à direita)



Fonte: Autoria própria (2024)

5.2 Teste de estabilidade preliminar

Para a realização do teste de estabilidade preliminar, foram formulados no dia 0 o controle e as pomadas com 3 e 5% de EPV, denominados, respectivamente, de C, A1 e A2 (Fotografia 2), que foram armazenadas em embalagens com barreira a luz e respeitando o espaço vazio (*head space*). As formulações apresentaram colorações visivelmente diferentes após a formulação, sendo o controle a amostra de cor amarelo mais claro, a A1 um amarelo claro intermediário as demais e a A2 um amarelo levemente alaranjado. Após um dia (24 horas), o teste preliminar foi iniciado.

Fotografia 2 - Controle, Amostra 1 (3%) e Amostra 2 (5%) após formulação

Fonte: Autoria própria (2024)

O Quadro 5 e Tabela 2 apresentam os resultados obtidos durante o teste preliminar, podendo ser observado que o controle (C) e a pomada com 3% de EPV (A1) mantiveram suas características organolépticas (Quadro 5), assim como o pH (Tabela 2). A pomada com 5% de EPV (A2) apesar de ter mantido o pH dentro da faixa esperada para produtos de uso tópico (5,5 a 7,5), não manteve as características organolépticas e também sofreu separação de fases a partir do quarto ciclo e, por esse motivo, foi considerada instável e não foi submetida aos próximos testes de estabilidade acelerada.

Quadro 5 - Análises organolépticas por ciclo por amostra

Amostra	Ciclo 1			Ciclo 2			Ciclo 3			Ciclo 4			Ciclo 5			Ciclo 6		
	A	C	O	A	C	O	A	C	O	A	C	O	A	C	O	A	C	O
Controle	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
A1 (3%)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
A2 (5%)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	S	N	N	S	N	N	S	N	N

Fonte: Autoria própria (2024). Nota: as letras A, C e O representam, respectivamente, as características organolépticas de aspecto, cor e odor. N e S, por sua vez, Normal e Separado.

Tabela 2 - pH médio durante o teste preliminar por ciclo por amostra

Ciclo	Controle	A1 (3%)	A2 (5%)
C1	6,82 ± 0,25	6,75 ± 0,10	6,61 ± 0,16
C2	6,54 ± 0,18	6,74 ± 0,01	6,80 ± 0,06
C3	6,70 ± 0,13	6,71 ± 0,02	6,79 ± 0,03
C4	6,46 ± 0,00	6,58 ± 0,19	6,31 ± 0,30
C5	6,55 ± 0,07	6,72 ± 0,03	6,80 ± 0,06
C6	6,56 ± 0,08	6,75 ± 0,19	6,16 ± 1,04

Fonte: Autoria própria (2024)

5.3 Teste de estabilidade acelerada

Durante o teste de estabilidade acelerada observou-se que o pH médio, como apresentado na Tabela 3, tanto do controle (C) quanto da amostra com EPV 3% (A1)

diminuíram com o passar do tempo, variando de 3 a 30% do valor inicial. Foi possível observar que apenas o C1 e A1, submetidos a luminosidade, não permaneceram dentro da faixa adequada de 5,5 a 7,5 para o pH e também sofreram alterações quanto as características organolépticas, como demonstrado no Quadro 6, de aspecto, cor e odor, tendo as demais mantido a conformidade.

Apesar da pomada ser composta majoritariamente por lanolina, que é um material graxo secretado pelas glândulas sebáceas dos carneiros, a diminuição do pH não pode ser seguramente associada a rancificação desse material. Isso porque a lanolina é pouco propícia ao rançamento, uma vez que a rancificação está associada a presença de compostos insaturados que são uma pequena porcentagem de sua composição. Dessa forma, é mais provável que a diminuição do pH esteja relacionada a presença de contaminação microbiológica.

Tabela 3 - pH médio por amostra

Amostra/Condições	Dia 0	Dia 7	Dia 15	Dia 30	Dia 65	Dia 91
C1	6,14 ± 0,22	6,25 ± 0,14	6,18 ± 0,24	5,88 ± 0,06	5,64 ± 0,20	4,72 ± 0,28
C2	6,48 ± 0,21	6,39 ± 0,03	6,24 ± 0,20	6,20 ± 0,05	6,37 ± 0,39	5,65 ± 0,07
C3	6,42 ± 0,13	6,24 ± 0,04	6,45 ± 0,04	6,42 ± 0,03	6,49 ± 0,09	5,84 ± 0,21
C4	6,53 ± 0,15	6,17 ± 0,13	6,12 ± 0,47	6,33 ± 0,04	6,40 ± 0,43	5,70 ± 0,64
C5	6,65 ± 0,03	6,12 ± 0,14	6,41 ± 0,09	6,40 ± 0,04	6,66 ± 0,04	5,89 ± 0,23
A1	6,27 ± 0,03	5,79 ± 0,09	5,95 ± 0,08	5,94 ± 0,12	5,18 ± 0,07	4,42 ± 0,15
A2	6,12 ± 0,09	5,78 ± 0,31	6,04 ± 0,03	6,11 ± 0,01	5,81 ± 0,13	5,68 ± 0,21
A3	6,08 ± 0,01	5,94 ± 0,02	5,96 ± 0,16	6,21 ± 0,10	6,14 ± 0,04	5,89 ± 0,05
A4	6,12 ± 0,05	6,03 ± 0,05	6,02 ± 0,06	6,29 ± 0,03	6,20 ± 0,19	5,71 ± 0,06
A5	6,10 ± 0,02	5,97 ± 0,06	6,19 ± 0,04	6,27 ± 0,05	6,18 ± 0,08	5,85 ± 0,05

Fonte: Autoria própria (2024). Nota: C amostra controle e A as amostras com EPV 3%, todas sob as mesmas 5 condições.

Quadro 6 - Análises organolépticas por ciclo por amostra

Amostra/Condições	Dia 0			Dia 7			Dia 15			Dia 30			Dia 65			Dia 91		
	A	C	O	A	C	O	A	C	O	A	C	O	A	C	O	A	C	O
C1	N	N	N	N	N	N	L	L	L	S	M	M	S	I	I	S	I	I
C2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
C3	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
C4	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
C5	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
A1	N	N	N	N	N	N	L	L	L	S	M	M	S	I	I	S	I	I
A2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
A3	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
A4	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
A5	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

Fonte: Autoria própria (2024). Nota: as letras A, C e O representam, respectivamente, as características organolépticas de aspecto, cor e odor. N, L, S, M e I, por sua vez, Normal, Levemente separado, Separado, Modificado e Intensamente modificado.

A Fotografia 3 evidencia a mudança de aspecto e coloração entre o controle (C1) e amostra (A1) submetidos a condição de luminosidade no 15º e no 30º dia. Isso pode ter ocorrido, segundo Leonardi (2008), devido a reação de oxidação pela

exposição à luz e ao calor, uma vez que a lanolina (45% da formulação) naturalmente oxida durante seu armazenamento, mas tem seu processo de oxidação catalisado por essas condições. Sendo assim, ainda que o antioxidante butil-hidroxitolueno (BHT) tenha sido utilizado, é possível que a auto-oxidação somada a exposição luminosa e ao calor tenha superado o controle do antioxidante.

Fotografia 3 - Comparativo de aspecto de controle e amostra submetidos a luminosidade (condição 1) no 15º dia e no 30º dia



Fonte: Autoria própria (2024)

O teste de espalhabilidade foi realizado para determinar a facilidade com que a pomada pode ser espalhada sobre a pele, como pode ser observado na Tabela 4 e nos Gráficos 1 e 2.

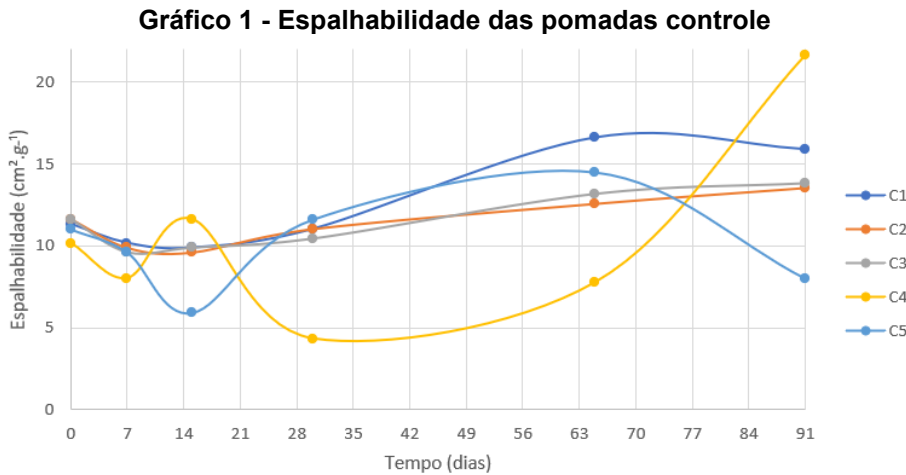
Tabela 4 - Espalhabilidade ($\text{cm}^2.\text{g}^{-1}$) das amostras de acordo com a equação (1)
(continua)

Amostra/Condições	Dia 0	Dia 7	Dia 15	Dia 30	Dia 65	Dia 91
C1	11,34	10,18	9,90	11,04	16,62	15,90
C2	11,64	9,90	9,62	11,04	12,57	13,53
C3	11,64	9,62	9,90	10,46	13,20	13,85
C4	10,18	8,04	11,64	4,34	7,79	21,65
C5	11,04	9,62	5,94	11,64	14,52	8,04
A1	11,64	11,34	11,34	14,52	15,90	20,03

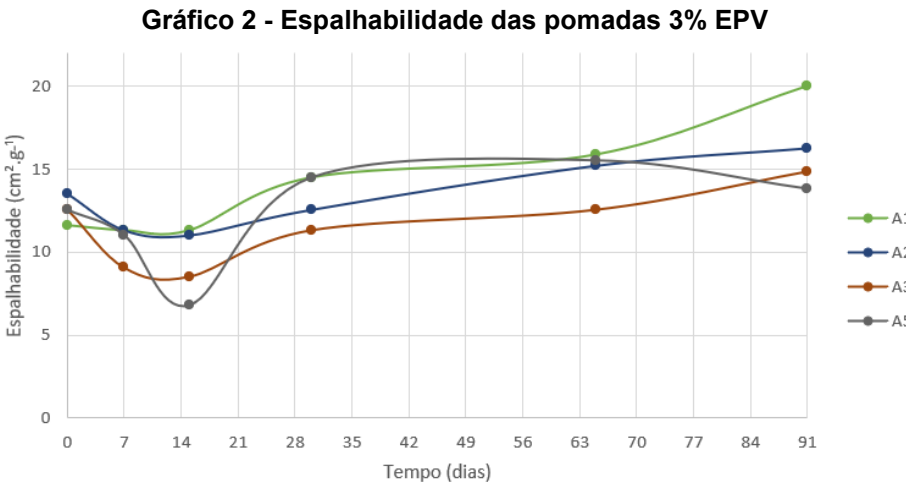
Tabela 4 - Espalhabilidade (cm².g⁻¹) das amostras de acordo com a equação (1) (conclusão)

Amostra/Condições	Dia 0	Dia 7	Dia 15	Dia 30	Dia 65	Dia 91
A2	13,53	11,34	11,04	12,57	15,21	16,26
A3	12,57	9,08	8,55	11,34	12,57	14,86
A4	11,95	7,79	11,64	8,55	10,75	20,03
A5	12,57	11,04	6,83	14,52	15,55	13,85

Fonte: Autoria própria (2024)



Fonte: Autoria própria (2024)



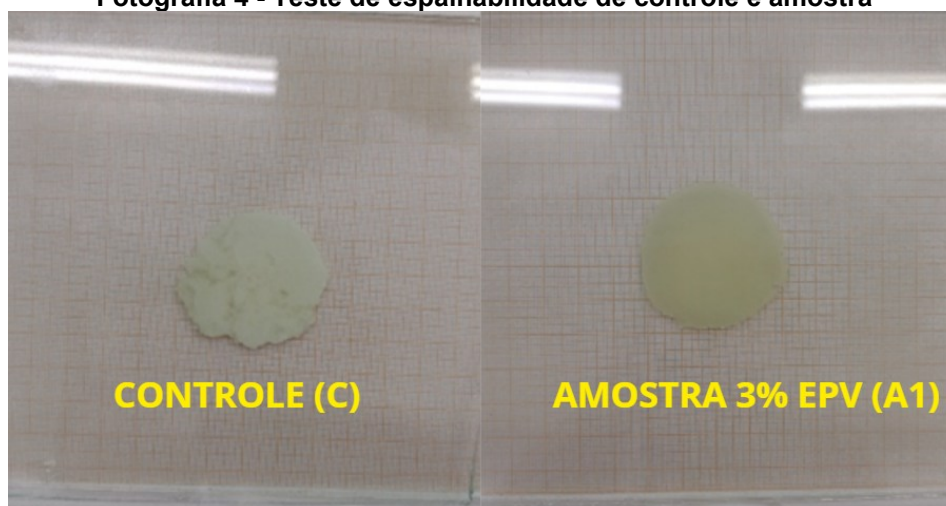
Fonte: Autoria própria (2024)

Para os valores de espalhabilidade, foi possível observar que o controle apresenta um comportamento mais irregular no intervalo considerado quando em comparação as amostras contendo 3% EPV. Para as pomadas contendo o extrato, mesmo se tratando de 5 condições diferentes, foi possível observar uma redução inicial nos valores de espalhabilidade nos primeiros 14 dias seguido de crescimento

dos valores de espalhabilidade para todas as amostras. O controle, por sua vez, aparenta um comportamento mais irregular entre as condições e entre uma mesma condição em dois momentos diferentes do experimento, o que sugere que a espalhabilidade pode ser afetada mais facilmente. Para determinar quanto e quais parâmetros afetam a espalhabilidade seriam necessários mais testes.

Ao comparar visualmente o controle com a amostra contendo EPV durante a realização do teste, foi observado que a amostra possuía um aspecto mais uniforme de espalhamento, alcançando seus valores finais de espalhabilidade com pesos inferiores ao peso máximo utilizado, conforme Fotografia 4. O controle, por sua vez, mesmo alcançando dimensões semelhantes, deslizava com menos facilidade e mesmo ao atingir o peso máximo apresentava aspecto não uniforme e com bordas irregulares. Essa observação sugere que os resultados de espalhabilidade da pomada contendo o extrato são superiores, já que os valores finais de espalhabilidade poderiam ser alcançados mesmo sem a adição de todo peso disponível. No entanto, como ao controle não foi adicionado o DMSO, seria interesse analisar também se o solvente por si só poderia melhorar a uniformidade e a facilidade de deslizar da pomada controle.

Fotografia 4 - Teste de espalhabilidade de controle e amostra



Fonte: Autoria própria (2024)

Quanto às análises microbiológicas, foram contadas as placas que possuíam números de colônias entre 25 e 250 para aeróbios mesófilos (bactérias) e entre 10 e 150 para bolores e leveduras (SILVA *et al.*, 2017). Os resultados encontrados estão representados na Tabela 5.

Tabela 5 - Contagem microbiológica do 1º e 91º dia (UFC/mL)

Amostra/Condições	Aeróbios mesófilos		Bolores e Leveduras	
	1º DIA	91º DIA	1º DIA	91º DIA
C1	ausente	ausente	ausente	$6,75.10^6$
C2	ausente	ausente	ausente	$9,08.10^6$
C3	ausente	ausente	$3,67.10^5$	$3,65.10^6$
C4	ausente	$7,49.10^6$	$3,67.10^5$	$1,59.10^7$
C5	ausente	ausente	ausente	$2,45.10^7$
A1	ausente	ausente	ausente	$1,45.10^7$
A2	ausente	ausente	ausente	$1,54.10^7$
A3	ausente	ausente	ausente	$1,24.10^7$
A4	ausente	ausente	$4,00.10^4$	$1,38.10^7$
A5	ausente	ausente	$3,33.10^3$	$5,13.10^6$

Fonte: Autoria própria (2024)

Para a análise microbiológica do 1º dia, foi observado que para aeróbios mesófilos nenhuma das amostras alcançou o mínimo utilizado para o intervalo de contagem, que era de 25 colônias, e por isso foram consideradas ausentes. Para bolores e leveduras, apenas quatro (C3, C4, A4 e A5) das dez amostras estavam dentro do intervalo de contagem, mas apresentaram resultados incoerentes. A falta de coerência se deve ao fato de que foi possível contar bolores e leveduras em diluições maiores, como é o caso do C3 a diluição 10^{-4} , mas em concentrações maiores (como, por exemplo, as diluições 10^{-3} e 10^{-2}), não foi possível. Sendo assim, ainda que C3 e C4 tenham superado o limite máximo de 5.10^2 UFC/mL, estes não foram considerados resultados confiáveis, devido a incoerências entre os dados de uma mesma amostra.

Para a contagem microbiológica do 91º dia, era esperado um aumento da população de microrganismos apesar dos conservantes, devido as condições que as amostras foram submetidas, já que a própria manipulação para os testes confere a adição de possíveis contaminantes a formulação. Devido a isto, mais diluições foram realizadas quando em comparação ao 1º dia. Para aeróbios mesófilos, foi constatada contaminação na amostra C4 de $7,49.10^6$ UFC/mL. Para bolores e leveduras, todas as dez amostras apresentaram contaminação de acordo com o que determina a Anvisa.

No entanto, quando analisado o resultado da contagem das diferentes diluições do 91º dia (10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6}), foi constatado, mais uma vez, que os resultados obtidos não são lógicos entre si, uma vez que as amostras mais diluídas apresentaram as maiores concentrações de microrganismos quando em comparação com as mesmas amostras menos diluídas. Ainda que o resultado tenha sugerido acidente de laboratório ou erro de procedimento experimental, a presença de contaminação existiu.

Sendo assim, algumas considerações foram feitas com o objetivo de reduzir contaminantes em testes futuros, como, por exemplo:

- a) A substituição da embalagem branca e opaca por uma bisnaga metálica e opaca, já que pomadas costumam ser comercializadas assim e a área de contato em cada retirada de amostra para teste seria muito menor.
- b) O estudo a respeito da alteração na quantidade dos conservantes estudados ou a substituição destes por outros.
- c) O aprimoramento da técnica de diluição para que haja mais homogeneidade nas soluções e os testes possam ser realizados em um intervalo menor de tempo, reduzindo os riscos de contaminação.
- d) A utilização de capela de fluxo laminar para que sejam reduzidos os riscos de contaminação.
- e) A utilização de materiais estéreis descartáveis, visto que a não coerência dos resultados pode estar associada a flambagem insuficiente das alças utilizadas.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A estabilidade constatada durante os testes (centrifugação, preliminares e acelerada) para a pomada com 3% de EPV (2,1 mg/mL) indicam uma possibilidade promissora de aplicação para este extrato com amplo potencial biotecnológico. No entanto, para concentrações superiores a 3%, ficou evidente que será preciso reformular a pomada, seja em composição ou em proporção dos ingredientes, para que seja então alcançada a estabilidade.

Apesar da grande maioria dos controles e amostras terem mantido as características organolépticas e de pH, não foi possível garantir a estabilidade do produto, uma vez que os resultados dos testes microbiológicos não foram conclusivos e sugerem o contrário do atestado nos outros dois parâmetros avaliados. Para a garantia da estabilidade, seria necessário que todos os aspectos avaliados obtivessem resultados positivos.

Como os resultados das características organolépticas e de pH são positivos e foi constatado que existe a possibilidade de que os resultados microbiológicos sejam consequência de erro de procedimento experimental, o ideal seria, pensando em perspectivas futuras, buscar o domínio da técnica de contagem para então refazer o teste de estabilidade acelerada e poder ter conclusões mais robustas.

Para além disso, é possível que a partir deste trabalho outros aspectos sejam explorados em estudos complementares, como a caracterização e avaliação do extrato quanto as normativas vigentes, a realização do teste de desafio do sistema conservante (*Challenge Test*) ou ainda o estudo da atividade antimicrobiana da pomada frente as cepas presentes nas lesões por pressão.

Apesar de não ter sido possível confirmar a estabilidade do produto, a manutenção de aspecto, cor, odor e do pH dentro do desejado, sugere que há potencial nesta formulação adaptada para veicular o extrato de própolis vermelha com eficácia.

REFERÊNCIAS

ABEMEL (Associação Brasileira dos Exportadores de Mel). O potencial da própolis brasileira no mundo. 2017. **Apresentação do Power Point**. Disponível em: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-setoriais/mel-e-produtos-das-abelhas/2017/43a-ro/app_propilis.pdf. Acesso em: 18 jun. 2024.

ALLEN JR, Loyd V.; POPOVICH, Nicholas G.; ANSEL, Howard C. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. Artmed Editora, 2013.

ANDRADE, J. K. S.; et al. Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region. **Food Research International**, v. 101, p. 129-138, 2017.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **Farmacopeia Brasileira**. Brasília: ANVISA, 2019.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **Resolução da diretoria colegiada - RDC Nº 630, de 10 de março de 2022**. Disponível em: <https://www.in.gov.br/web/dou/-/resolucao-rdc-n-630-de-10-de-marco-de-2022-386107555>. Acesso em: 18 jun. 2024.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **Resolução da diretoria colegiada - RDC Nº 45, de 9 de agosto de 2012**. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0045_09_08_2012.html. Acesso em: 20 jun. 2024.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos**. Brasília: ANVISA, 2004.

ARAÚJO, E. A.; et al. Aspectos coloidais da adesão de micro-organismos. **Química Nova**, São Paulo, vol. 33, no 9, p. 1940-1948, 2010.

BARROS, K. N.; et al. **Desenvolvimento de formulação de uso tópico com ação cicatrizante contendo extrato de Pereskia aculeata**. Iniciação Científica CESUMAR. Jan./Jun. 2010, v. 12, n. 1, p. 29-37.

BASÍLIO, J.A.D. **Desenvolvimento e avaliação in vitro da atividade cicatrizante de membranas poliméricas incorporadas com própolis vermelha**. 2018. 103 f. Tese (Doutorado na Rede Nordeste de Biotecnologia: Biotecnologia na Saúde) – Instituto de Química e Biotecnologia, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste em Biotecnologia - RENORBIO, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2018.

BERRETTA, A. A.; et al. **Functional properties of Brazilian propolis: from chemical composition until the market**. Superfood and functional food-an overview of their processing and utilization, v. 4, n. 1, p. 74, 2017.

BISPO JUNIOR, W.; et al. Atividade antimicrobiana de frações da própolis vermelha de Alagoas, Brasil. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Alagoas, v. 33 n. 1, p. 3–10, jul. 2012.

BORELLA, J. C.; et al. Avaliação da espalhabilidade e do teor de flavonoides em forma farmacêutica semissólida contendo extratos de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 31, n. 2, 2010.

CABRAL, I. S. R. **Isolamento e identificação de compostos com atividade antibacteriana da própolis vermelha brasileira**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

DA SILVA, V.C.; et al. COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA PRÓPOLIS DE QUATRO ESPÉCIES DE ABELHAS. **Ciência na Sociedade: Revista Científica do Instituto Nikola Tesla**, v. 1, n. 2, 2023.

DE ALBUQUERQUE, K. S. P. **PROPOLIS VERMELHA DE ALAGOAS: uma oportunidade de Negócio Sustentável**. 2021

DE MENDONÇA, I. C.G.; et al. Brazilian red propolis: phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, p. 1-12, 2015.

DE PAULA, A. G.; IZIDORO, L. D; RIBEIRO, I.S. Revisão integrativa sobre atividade antimicrobiana da própolis vermelha brasileira. **15º jornada científica e tecnológica e 12º simpósio de pós-graduação do ifsuldeminas**, v. 14, n. 1, 2022.

FRANÇA, A. Z.; et al. Própolis: diferentes tipos e uso. **Sul Brasil Rural**, v. 245, p. 1, 2020.

FERREIRA, Joselena Mendonça; NEGRI, Giuseppina. Composição química e atividade biológica das própolis brasileiras: verde e vermelha. **Editora Verde**, 2018.

GALINDO, A. B. **Caracterização do extrato de própolis vermelha, avaliação de suas propriedades biológicas e desenvolvimento de gel à base do extrato**. 2007. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2007.

HEIDARI-SURESHJANI, M.; et al. Antimicrobial effect of aqueous, ethanol, methanol and glycerin extracts of *Satureja bachtiarica* on *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis*. **Zahedan journal of research in medical sciences**, v. 17, n. 7, 2015.

INFARMED (Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P.). **Farmacopeia Portuguesa**, v. 9, 2008.

JACOB, S. W.; HERSCHLER, R. Pharmacology of DMSO. **Cryobiology**, v. 23, n. 1, p. 14-27, 1986.

KNORST, M. T. **Desenvolvimento tecnológico de forma farmacêutica plástica contendo extrato concentrado de *Achyrocline satureioides*. Lam. DC. *Compositae* (Marcela)**. Porto Alegre, 1991. 228p. [Dissertação de Mestrado. Faculdade de Farmácia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul].

LEONARDI, G. R. **Cosmetologia Aplicada**. 2ª ed. São Paulo: Santa Isabel, 2008.

LI, Feng et al. Study on the constituents of Mexican propolis and their cytotoxic activity against PANC-1 human pancreatic cancer cells. **Journal of natural products**, v. 73, n. 4, p. 623-627, 2010.

LIMA, A. B. S.; et al. Red Propolis: Chemical and Mid-Infrared Spectroscopic Characterization and Classification by Geographic Origin. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 35, n. 9, p. e-20240055, 2024.

LUCENA, M. N.; MENDES, M.M.; BRANDEBURGO, M. I. H. Avaliação da estabilidade da pomada à base de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Conville e sua eficácia na neutralização dos efeitos locais induzidos pela peçonha de *Bothrops pauloensis*. **Horizonte Científico**, v. 3, n. 1, p. 2009, 2009.

LUSTOSA, S. R.; et al. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 447-454, 2008.

MACHADO, C. S.; et al. Seeking the regional identity of brown propolis produced in southern Brazil and linked to total levels of bioactive compounds and biological activity. **ACS Food Science & Technology**, v. 1, n. 2, p. 176-185, 2021.

NAUMANN, E. **ELABORAÇÃO DE FORMULAÇÕES COSMÉTICAS CLAREADORAS DE MANCHAS COM A ADIÇÃO DE UM EXTRATO DE COGUMELO**. 2023. 93f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus Ponta Grossa, 2023.

NUNES, L. C. C.; et al. Avaliação das propriedades físico-químicas e aspectos legais de extratos de própolis comercializados no mercado brasileiro. **Editores Verde**, v. 89, n. 1, p. 59-63, 2008.

OLIVEIRA, G. C. C. **Própolis: uma revisão sobre origem, características, composição, aplicação e perspectivas**. 2023. 35f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus de Rio Claro, 2023.

ORLATO, D. **Efeitos do DMSO (dimetilsulfóxido), administrado por via intravenosa, sobre as funções renal e hepática, perfil hidrossalino e hemograma de cães saudáveis**. 2006. vii, 50 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2006.

PICCINELLI, A. L.; et al. Isoflavonoids isolated from Cuban propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 23, p. 9010-9016, 2005.

SALATINO, A.; et al. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, v. 2, n. 1, p. 33, 2005.

SALGUEIRO, F. B. **Caracterização da própolis verde brasileira: substâncias fenólicas, atividade biológica e análise quimiométrica**. 2016. 172 p. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

SEBRAE (Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas). **Indicações Geográficas Brasileiras: Mel e Própolis**; SEBRAE: Brasília, 2022.

SILVA, B. B.; et al. Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of Brazilian propolis. **Evidence-based complementary and alternative medicine, Oxford**, vol. 5, no 3, p. 313-316, 2008.

SILVA, K. C. M. **Os diferentes tipos de própolis e suas indicações: uma revisão da literatura**. 2018. 54 f Dissertação (Mestrado Acadêmico em Sistemas Agroindustriais) - Programa de Pós-Graduação em Sistemas Agroindustriais, Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar, Universidade Federal de Campina Grande, Pombal, Paraíba, Brasil, 2018.

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

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. Editora Blucher, 2017. E-book. ISBN 9788521212263. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788521212263/>. Acesso em: 19 jun. 2024.

SILVA, R. A.; et al. Características físico-químicas e atividade antimicrobiana de extratos de própolis da Paraíba, Brasil. **Ciência Rural**, v. 36, p. 1842-1848, 2006.

TAYLOR, P. W.; STAPLETON, P. D.; LUZIO, J. P. (2002). New ways to treat bacterial infections. **Drug discovery today**, 7(21), 1086–1091. [https://doi.org/10.1016/s1359-6446\(02\)02498-4](https://doi.org/10.1016/s1359-6446(02)02498-4).

TERRA, M. R.; et al. *Enterococcus spp* e *Staphylococcus aureus* EM LESÃO POR PRESSÃO. **Brazilian Journal of Surgery & Clinical Research**, v. 18, n. 2, 2017.

TORRES, M. L.; et al. Uso de pomada de própolis brasileira tipificada e dimetilsulfóxido para tratamento de feridas cirúrgicas. **Brazilian Journal of Natural Sciences**, [S. l.], v. 4, n. 2, p. E1422021, 1-9, 2021.

WEBER, Max. **Ciência e política: duas vocações**. 18. ed. São Paulo: Cultrix, 2011.