



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E BIODIVERSIDADE

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE
LEISHMANICIDA DOS EXTRATOS HIDROETANÓLICOS
DE PRÓPOLIS VERMELHA E *Dalbergia ecastophyllum*
(FABACEAE)**

JALTAIRA MONTALVÃO ETINGER DE ARAUJO

2014



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E BIODIVERSIDADE**

JALTAIRA MONTALVÃO ETINGER DE ARAUJO

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE LEISHMANICIDA DOS
EXTRATOS HIDROETANÓLICOS DE PRÓPOLIS VERMELHA E *Dalbergia
ecastophyllum* (FABACEAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Sergipe, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agricultura e Biodiversidade, área de concentração em Agricultura e Biodiversidade, para obtenção do título de “Mestre em Ciências”.

Orientador
Prof. Dr. Ricardo Scher

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE – BRASIL
2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

A663c Araújo, Jaltaira Montalvão Etinger de
Caracterização química e atividade leishmanicida dos extratos hidroetanólicos de própolis vermelha e *Dalbergia ecastophyllum* (FABACEAE) / Jaltaira Montalvão Etinger de Araújo ; orientador Ricardo Scher. – São Cristóvão, 2014. 53 f. : il.

Dissertação (mestrado em Agricultura e Biodiversidade) – Universidade Federal de Sergipe, 2014.

1. Própolis. 2. *Dalbergia ecastophyllum*. 3. Leishmaniose. I. Scher, Ricardo, orient. II. Título.

CDU 638.135

JALTAIRA MONTALVÃO ETINGER DE ARAUJO

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE LEISHMANICIDA DOS
EXTRATOS HIDROETANÓLICOS DE PRÓPOLIS VERMELHA E *Dalbergia
ecastophyllum* (FABACEAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Sergipe, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agricultura e Biodiversidade, área de concentração em Agricultura e Biodiversidade, para obtenção do título de “Mestre em Ciências”.

APROVADA em 10/12/2014

Prof. Dr. Edilson Divino de Araújo
UFS

Eduardo Caio Torres Santos
FIOCRUZ

Prof. Dr. Ricardo Scher
UFS
(Orientador)

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE – BRASIL
Dedico este trabalho

À DEUS,

Ser sobrenatural, ao qual dedico a minha vida, e sempre com toda a sua bondade me ofereceu desafios em minha jornada de estudos, tornando as conclusões cada vez mais satisfatórias.

A minha Mãezinha

Por todo o amor maternal, sacrifícios, votos de confiança e incentivos aos estudos desde as séries iniciais, sempre na tentativa de formar em seu filho uma base científica e cultural.

Ao meu esposo Daniel

Pelo amor, companheirismo, compreensão e incentivos.
Muito Obrigada por fazer parte da minha vida!!!

As minhas filhas Analice e Ana Clara

Por tornar meus dias cada vez mais divertidos, e principalmente pelo olhar infantil, carinho e amor incondicional.
Amo vocês, meus anjinhos!!

Aos amados irmãos Joseph, Jaclese, Jacleuma, Jaclelia, Jacqueline, John, Djanira e Djane

Agradeço em igual proporção, pelo simples fato de existirem, o que sinto por eles resume-se em uma palavra “Família”
Um obrigada muito especial!!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, **Profº Dr. Ricardo Scher** pelo conhecimento, confiança, “paciência” e que mesmo diante das diversas dificuldades na execução deste trabalho manteve-se confiante na finalização;

Aos professores do PROBIOTEC e PPGAGRI por todo aprendizado, desafios e estímulo a busca constante pelo conhecimento;

A **Profª Dra. Roberta Fernandes** que em diversos momentos me forneceu orientações científicas.

A **Profª Dra. Cristiane Bani** e a colega **Cristina** pelas orientações nos testes de citotoxicidade;

A querida amiga **Msc. Lucyana** um agradecimento especial pelas orientações na caracterização química das amostras, que mesmo em meio a diversas atividades cedeu parte de seu tempo para acompanhar-me nos experimentos.

Aos padrinhos de matrimônio **Profº Dr. Edilson** e a **Profª Dr. Yzila Liziane**, os quais durante a graduação mais do que me orientaram em trabalhos de iniciação científica, me ensinaram a fazer extensão do conhecimento. Os três pilares do conhecimento sempre enfatizado pelo Profº Edilson sempre estará em minha memória. Obrigada!

Ao apicultor **Magno** de Brejo Grande/SE por acompanhar-me nas coletas dos espécimes vegetais.

As parceiras de laboratório **Flaviane** e **Katily** pela paciência e dedicação nas orientações das técnicas de rotina laboratorial;

As amigas **Aline** e **Cirlane** que muito pacientemente me orientaram em parte deste estudo;

As amigas **Juliana** e **Nancy** pelos momentos de descontração e desabafos em meio à rotina de experimentos (faladeiras de plantão);

Enfim a todos que direta ou indiretamente tornaram possível a finalização desta pesquisa científica.

Muito obrigada!

"Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos."

[Albert Einstein]

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
2.1 Leishmanias	16
2.1.1 Vetores e Reservatórios da leishmania	17
2.1.2 Ciclo Biológico da leishmania.....	18
2.1.3 Leishmanioses.....	20
2.1.4 Epidemiologia das Leishmanioses.....	22
2.1.5 Quimioterapia da leishmaniose.....	23
2.2 Terapêuticos Naturais	25
2.3 Própolis Vermelha e sua origem botânica	25
2.4 Atividade leishmanicida da Própolis	29
3 OBJETIVO GERAL.....	31
3.1 Objetivos Específicos	31
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1 Amostras de própolis e <i>Dalbergia ecastophyllum</i>	32
4.2 Obtenção dos extratos	32
4.2.1 Extrato Hidroetanólico da Própolis Vermelha (EHPV).....	32
4.2.2 Extrato Hidroetanólico de <i>Dalbergia ecastophyllum</i> (EHDe).....	33
4.3 Caracterização química dos extratos da Própolis Vermelha e <i>Dalbergia ecastophyllum</i>	33
4.4 Culturas de <i>Leishmania</i>	34
4.5 Viabilidade <i>in vitro</i> sobre formas promastigotas	34
4.6 Citotoxicidade dos extratos frente a Macrófagos Humanos	35
4.7 Análise estatística	36
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1 Caracterização fenólica dos extratos hidroetanólicos da própolis vermelha (EHPV) e de <i>Dalbergia ecastophyllum</i> (EHDe)	37
5.2 Efeito dos extratos hidroetanólicos da própolis vermelha e <i>Dalbergia ecastophyllum</i> sobre formas promastigotas de <i>Leishmania chagasi</i> e <i>Leishmania amazonensis</i>	41
5.3 Ensaio citotóxico do EHPV sobre macrófagos humanos (MTT)	44
6 CONCLUSÕES	47
Referências Bibliográficas.....	48

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 Micrografia das formas morfológicas mais comuns de <i>Leishmania</i> spp. (a) Promastigota; (b) Amastigotas	17
2 Taxonomia da <i>Leishmania</i>	18
3 Fêmea de flebotomíneo adulto.....	19
4 Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp.....	20
5 Índice de endemicidade da LC (A) e LV (B), a nível mundial em 2012	23
6 Amostras da própolis vermelha (A) e própolis verde (B).....	27
7 <i>Dalbergia ecastaphyllum</i> , origem botânica da própolis vermelha.....	28
8 Território do baixo São Francisco em Sergipe.....	33
9 Própolis em caixa racional de abelhas.....	33
10 Cromatogramas obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) dos extratos hidroetanólicos da Própolis Vermelha (A) e de <i>D. ecastaphyllum</i> (B).....	38
11 Estrutura química dos compostos fenólicos encontrados nos extratos.....	39
12 Efeito dose-dependente do extrato hidroetanólico da própolis vermelha sobre formas promastigotas de <i>L. chagasi</i> (A) e <i>L. amazonensis</i> (B) cultivadas durante 24h. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos por média \pm desvio padrão.....	42
13 Efeito dose-dependente do extrato hidroetanólico de <i>Dalbergia ecastaphyllum</i> sobre formas promastigotas de <i>L. chagasi</i> (A) e <i>L. amazonensis</i> (B) cultivadas durante 24h. Os experimentos foram realizados em duplicata e os resultados expressos por média \pm desvio padrão.....	42
14 Efeito dose-dependente do extrato hidroetanólico da própolis vermelha sobre macrófagos J774 incubados durante 24h. Os experimentos foram realizados em duplicata e os resultados expressos por média \pm desvio padrão	46

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Principais espécies de <i>Leishmania</i> patogênicas em humanos nas Américas. ..	22
2	Atuais compostos utilizados para o tratamento da leishmaniose.....	25
3	Distribuição das concentrações ($\mu\text{g/mL}$) dos extratos utilizados para os experimentos de viabilidade em promastigotas de <i>L. chagasi</i> e <i>L. amazonensis</i>	36
4	Rendimento dos extratos hidroetanólicos da própolis vermelha e da entrecasca de <i>Dalbergia ecastophyllum</i>	38
5	Valores de IC_{50} para formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. chagasi</i> tratadas com EHPV e EHDe.....	43
6	Valores de CC_{50} para macrófagos J774 e IC_{50} para formas promastigota de <i>Leishmania amazonensis</i> e <i>Leishmania chagasi</i> e seus respectivos índices de seletividade (IS).....	46

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

OMS	Organização Mundial de Saúde
LV	Leishmaniose Visceral
LT	Leishmaniose Tegumentar
LCL	Leishmaniose Cutânea Localizada
LD	Leishmaniose Disseminada
LCD	Leishmaniose Cutânea Difusa
LM	Leishmaniose Mucosa
LC	Leishmaniose Cutânea
SbV	Antimonio Pentavalente
WEP	Extrato Própolis Verde
MA	Antimoniato de Meglumina
EHPV	Extrato Hidroetanólico da Própolis Vermelha
EHD _e	Extrato Hidroetanólico de <i>Dalbergia ecastophyllum</i>
IC ₅₀	Concentração Inibitória em 50%
Sb ^{III}	Antimoniato Trivalente
MTT	brometo de 3-[4,5-dimetiltiazolil]-2,5-difeniltetrazólio
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
PBS	Phosphate Buffered Saline
DMSO	Dimetilsulfóxido
CC ₅₀	Concentração Citotóxica em 50%
ND	Não Determinado
DNDi	Drugs for Neglected Diseases initiative
fr-Hex	fração hexânica
fr-Clo	fração clorofórmica
CLAE-FR	Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa
UFS	Universidade Federal de Sergipe
DMO	Departamento de Morfologia
BOD	Biological Oxygen Demand
LCP	Laboratório de Análises de Compostos Orgânicos Poluentes
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IS	Índice de Seletividade

RESUMO

Araujo, Jaltaira Montalvão Etinger. **Caracterização Química e Atividade Leishmanicida dos Extratos Hidroetanólicos de Própolis Vermelha e *Dalbergia ecastophyllum* (Fabaceae)**. São Cristóvão: UFS, 2014. (Dissertação – Mestrado em Agricultura e Biodiversidade).*

Os agentes etiológicos da leishmaniose são protozoários tripanossomatídeos do gênero *Leishmania*, parasito intracelular obrigatório das células do sistema fagocítico mononuclear, com uma forma flagelada (promastigota), encontrada no tubo digestivo do inseto vetor e outra aflagelada intracelular (amastigota). Na quimioterapia da leishmaniose, são utilizados os antimoniais pentavalentes como fármacos de primeira escolha. Outros medicamentos tais como pentamidina e anfotericina B, têm sido empregados como drogas alternativas. Entretanto, estas drogas necessitam de administração parenteral em longo prazo e exibem efeitos secundários graves. Logo, a elevada toxicidade, os custos e a resistência associada aos tratamentos disponíveis fazem com que seja crescente a busca por novas substâncias que possam ser utilizadas na terapia, especialmente aquelas obtidas de fontes naturais. O Objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil químico e o efeito leishmanicida *in vitro* de extratos da própolis vermelha e *Dalbergia ecastophyllum*, em formas promastigotas de *Leishmania chagasi* e *Leishmania amazonensis*. As amostras de própolis vermelha e *Dalbergia ecastophyllum* foram coletadas na região do baixo São Francisco em Sergipe, Brasil. A caracterização química do extrato hidroetanólico da própolis e *D. ecastophyllum* foi feita por Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR). A efeito leishmanicida dos extratos da própolis vermelha e da *D. ecastophyllum* foi feita em promastigotas de *Leishmania chagasi* e *Leishmania amazonensis* utilizando método colorimétrico com Resazurina. A citotoxicidade do extrato de própolis foi avaliada em macrófagos humanos da linhagem J774 utilizando o método do MTT. Pela análise química puderam ser identificados no extrato da própolis vermelha os seguintes compostos fenólicos: Ácido Vanílico, Ácido Ferúlico, Rutina, Isoliquiritigenina, Formononetina e Biochanina A, enquanto que no extrato de *D. ecastophyllum* foram identificados: ácido vanílico, Isoliquiritigenina, Formononetina e Biochanina A. Quanto a avaliação da viabilidade, as IC₅₀ obtidas para a própolis vermelha foram: 21,54 µg/mL para promastigotas de *L. chagasi* e 9,73 µg/mL para *L. amazonensis*. Para o extrato de *D. ecastophyllum* as IC₅₀ obtidas foram 70,47 µg/mL para *L. chagasi* e 53,42 µg/mL para *L. amazonensis*. A CC₅₀ do extrato de própolis em macrófagos foi de 72,63 µg/mL. Tais resultados mostram que o extrato da própolis vermelha do Baixo São Francisco tem a *D. ecastophyllum* como origem botânica e que o mesmo apresenta potencial leishmanicida, com baixa toxicidade.

Palavras-chave: Própolis Vermelha, *Dalbergia ecastophyllum*, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania chagasi*.

* Comitê Orientador: Ricardo Scher – UFS (Orientador)

ABSTRACT

Araujo, Jaltaira Montalvão Etinger. **Chemical characterization and leishmanicidal activity of hydroethanolic extracts of Red Propolis and *Dalbergia ecastophyllum* (Fabaceae)**. São Cristóvão: UFS, 2014. (Dissertation - Master in Agriculture and Biodiversity)*.

Leishmania is the etiological agent of leishmaniasis. are protozoan trypanosomes genus, obligatory intracellular parasite of the phagocytic system cells mononuclear, with a flagellate form (promastigote), found in the intestinal tract of the insect vector and other intracellular aflagellate (amastigote). In leishmaniasis chemotherapy, pentavalent antimonial are used as first choice drugs. Other drugs such as pentamidine and amphotericin B have been used as alternative drugs. However, these drugs require parenteral administration in the long-term and exhibit serious side effects. Thus, the high toxicity, costs and associated resistance treatments available make it increasingly a search for new substances which can be used in therapy, especially those obtained from natural sources. The objective of this study was to evaluate the chemical profile and the leishmanicide effect *in vitro* red propolis extracts and *Dalbergia ecastophyllum* in promastigotes forms of *Leishmania chagasi* and *Leishmania amazonensis*. Red Propolis samples and *Dalbergia ecastophyllum* were collected in the low São Francisco River in Sergipe state, Brazil. The chemical characterization of hydroethanolic extract of propolis was made by Reverse Phase High-performance liquid chromatography (HPLC-FR). Leishmanicidal effect of red propolis extracts and *D. ecastophyllum* were made in promastigotes of *Leishmania chagasi* and *Leishmania amazonensis* by using the Alamar Blue staining method. The cytotoxicity of the propolis extract was evaluated in human macrophages J774 line using the MTT method. By chemical analysis could be identified in red propolis extracts the following phenolic compounds: Vanillic Acid, Ferulic Acid, Rutin, Isoliquiritigenin, Formononetin and Biochanin A, whereas the *D. ecastophyllum* extract were identified: vanillic acid, Isoliquiritigenin, Formononetin and Biochanin A. As the viability assessment, the obtained IC₅₀ for red propolis were: 21.54 µg/mL for *L. chagasi* and 9.73µg/mL for *L. amazonensis*. For the extract of *D. ecastophyllum* the IC₅₀ obtained were 70.47 µg/mL for *L. chagasi* and 53.42 µg/mL for *L. amazonensis*. The CC₅₀ of propolis extract in macrophages was 72.63 µg/mL. These results show that the red propolis extract of the low São Francisco has the *D. ecastophyllum* as botanical origin and it presents leishmanicide potential, with low toxicity.

Keywords: Red Propolis, *Dalbergia ecastophyllum*, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania chagasi*.

*Advisor Committee: Ricardo Scher-UFS (Adviser)

1. INTRODUÇÃO

Os agentes etiológicos da leishmaniose são protozoários tripanossomatídeos do gênero *leishmania*, parasito intracelular obrigatório das células do sistema fagocítico mononuclear, com uma forma flagelada (promastigota), encontrada no tubo digestivo do inseto vetor e outra aflagelada intracelular (amastigota) (Brasil, 2006).

Na quimioterapia da leishmaniose, são utilizados os antimoniais pentavalentes como fármacos de primeira escolha (Rath et al, 2003). Outros medicamentos tais como pentamidina e anfotericina B, têm sido empregados como drogas alternativas. Entretanto, estas drogas necessitam de administração parenteral em longo prazo e exibem efeitos secundários graves (Kayser et al, 2003).

Logo, a elevada toxicidade, os custos e a resistência associada aos tratamentos disponíveis fazem com que seja crescente a busca por novas substâncias que possam ser utilizadas na terapia, especialmente aquelas obtidas de fontes naturais (Barret; Gilbert, 2002).

Os produtos naturais originados a partir de micro-organismos, animais e principalmente plantas medicinais, têm sido empregados no tratamento de doenças por milhares de anos (Harvey, 2008). A utilização tradicional de espécies vegetais aliadas ao desenvolvimento científico tem propiciado grandes avanços no estudo terapêutico de plantas medicinais e, em consequência, na descoberta de novas substâncias com promissoras atividades biológicas e farmacológicas, sendo usadas como matéria-prima para a síntese de moléculas complexas ou como protótipos para o desenvolvimento de novos medicamentos (Newman, 2008).

Para o tratamento das doenças infecciosas, por exemplo, de um total de 230 fármacos aprovados, entre os anos de 1950 e 2006, 137 foram obtidos de fontes naturais ou baseados nestes produtos (Newman & Cragg, 2007). Assim, a variedade de metabólitos encontrados na natureza torna-se representativa na descoberta e desenvolvimento de novos produtos bioativos, em função da sua diversidade química estrutural (Nicolaou; Chen; Dalby, 2009).

A própolis é um produto resinoso coletado pelas abelhas (*Apis mellifera*) a partir de exsudatos de plantas, principalmente resina de broto misturado com cera de abelha, tem a função de formar material de vedação em favos de mel, suavizar as paredes internas e proteger a entrada da colmeia contra invasores. Estas propriedades naturais da própolis na colmeia foram sugestivas para pesquisas científicas das atividades biológicas da própolis já constatadas, dentre elas, ação bacteriana, antifúngica e antioxidante (Marcucci; Ferreres; Garcı́, 2001; Trusheva et al, 2006). Estudos com a utilização de amostras de própolis coletadas em diferentes regiões do Brasil apresentaram efeitos contra tripanossomatídeos,

com resultados promissores para o tratamento da doença de Chagas e da leishmaniose (Salomão et al., 2008).

Estudos realizados categorizaram a própolis brasileira em 13 tipos de acordo com aparência, coloração e características químicas. O 13º tipo da própolis é o mais recente observado e foi localizado ao longo de praias e rios do Nordeste brasileiro inclusive no estado de Sergipe, e teve sua origem botânica identificada como *Dalbergia ecastophyllum*. Esta própolis, denominada de própolis vermelha, devido à predominância desta coloração, tem apresentado várias atividades biológicas em ensaios *in vitro* (Park; Alencar; Aguiar, 2002; Alencar et al., 2005; Dausch et al, 2008; Silva, 2008).

Foram relatadas propriedades da própolis vermelha do Nordeste brasileiro, tais como, atividade antibacteriana, antifúngica, leishmanicida, entre outras (Ayres et al., 2011; Bittencourt, 2008; Maia-Araújo, 2011). Frozza et al., 2013 indicam que a própolis vermelha de Sergipe é composta de moléculas complexas e apresenta propriedades biológicas importantes relacionadas com a capacidade antioxidante e inibição da proliferação de células tumorais de forma seletiva.

Em se tratando de variedades de própolis que são endêmicas do Nordeste, é importante ressaltar que não podem ser equiparadas a outras localidades, uma vez que as variedades de própolis são formadas a partir de condições ambientais específicas que dificilmente poderiam ser iguais em outras regiões. As perspectivas futuras relacionadas às variedades de própolis nordestinas dependem, portanto, dos investimentos em organização produtiva, pesquisa e desenvolvimento de tecnologias associadas. Desta forma, os resultados de pesquisas com a própolis agregam valor científico ao produto, indicam a qualidade da própolis, somando a esta variedade encontrada em Sergipe potencial biológico ainda não conhecido no mercado (Maia-Araujo, 2009).

Diversos grupos de pesquisa em todo o mundo vêm estudando extratos e substâncias de origem vegetal e apícola com promissor potencial efeito leishmanicida. Estes extratos são testados isoladamente, ou combinados com fármacos já utilizados com o intuito de amenizar reações tóxicas destes quimioterápicos já conhecidos. A descoberta por potenciais substâncias leishmanicidas já utilizadas na farmacologia como a própolis facilita a utilização futura deste produto para o tratamento de leishmanioses.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Leishmanias

Protozoários do gênero *Leishmania* constituem os agentes etiológicos de um conjunto de doenças denominadas Leishmanioses. O gênero *Leishmania* engloba um grupo de protozoários flagelados da família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida. Compreende organismos unicelulares caracterizados pela presença de um flagelo e uma estrutura rica em DNA, o cinetoplasto (Grimaldi; Tesh, 1993).

Leishmania spp. apresenta duas formas evolutivas: promastigota e amastigota. Os promastigotas são formas alongadas, flageladas, com cerca de 30 µm de comprimento. São extracelulares encontrados no trato digestivo do vetor invertebrado (Figura 1a). Os amastigotas são formas arredondadas, com aproximadamente 10 µm de diâmetros (Figura 1b). São intracelulares obrigatórios de células do sistema fagocitário de mamíferos.

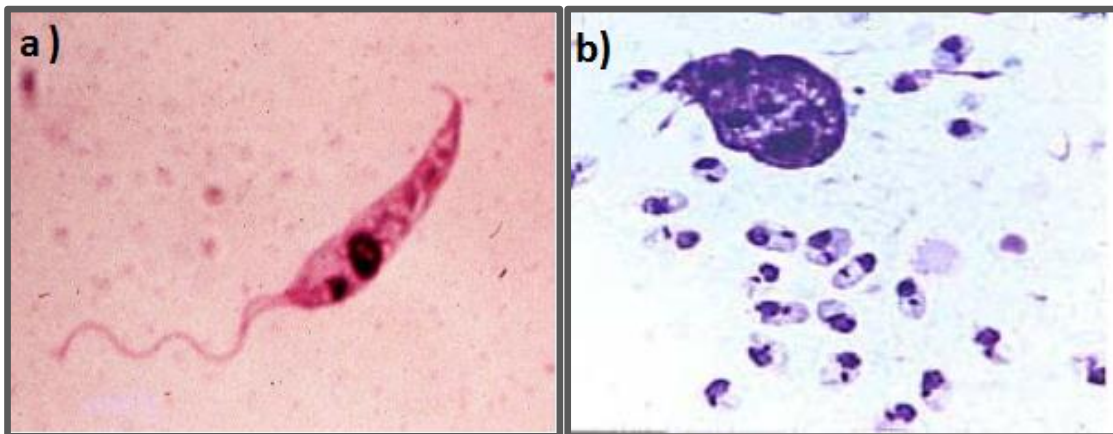
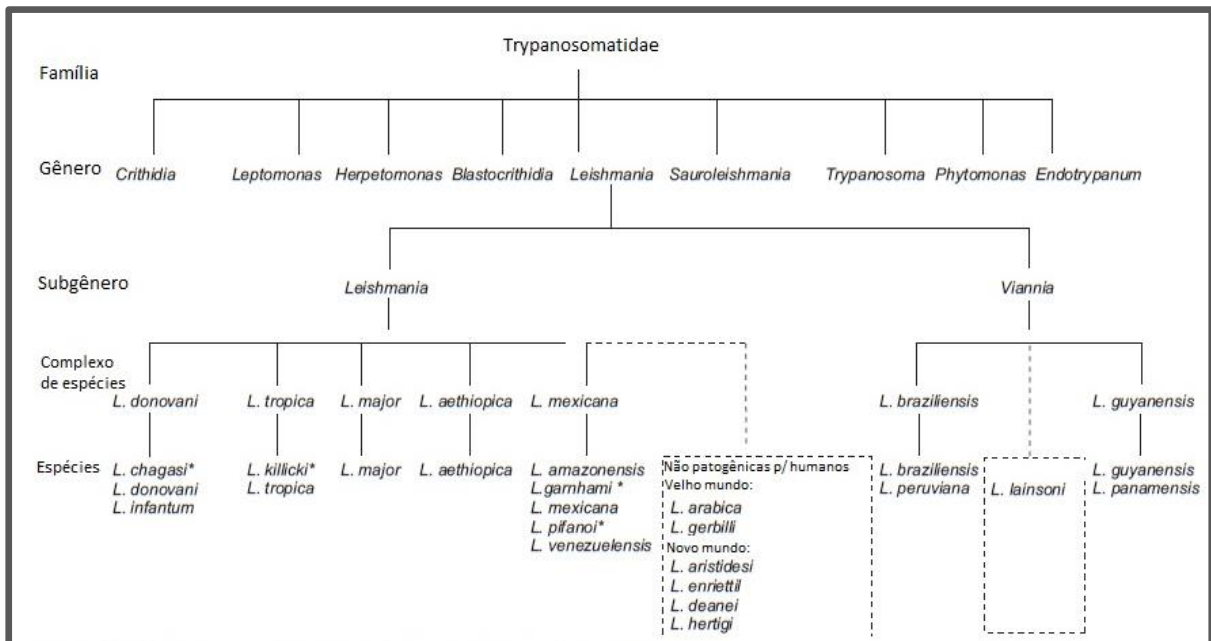


Figura 1: Micrografia das formas morfológicas mais comuns de *Leishmania* spp. (a) Promastigota; (b) Amastigotas. Fonte: Silva, 2008

Os parasitos de todas as espécies de *Leishmania* são morfologicamente similares, sendo necessárias análises bioquímicas para uma identificação formal no nível de espécie (Barral; Costa, 2011).

O protozoário leishmania foi descrito pela primeira vez em 1903 por Leishman e Donovan, trabalhando separadamente. Desde então este organismo é caracterizado como pertencente a um grupo complexo de espécies dos quais pelo menos 20 delas causam infecções em humanos (Markle; Makhoul, 2004). No Novo Mundo, são reconhecidas oito espécies de *Leishmania*, responsáveis por causar leishmanioses ao homem, e pertencentes ao subgênero *Vianna* (*V*) e *Leishmania* (*L*), onde os agentes etiológicos correspondentes são: *Leishmania* (*V*) *braziliensis*, *Leishmania* (*V*) *guyanensis*, *Leishmania* (*V*) *panamensis*,

Leishmania (V) lainsoni, *Leishmania (L) mexicana*, *Leishmania (L) amazonensis*, *Leishmania (L) venezuelensis* e *Leishmania (L) chagasi* (Grimaldi; Tesh, 1993). (Figura 2).



* A taxonomia está em discussão

Figura 2: Taxonomia da *Leishmania*. (Fonte: OMS, 2010)

2.1.1 Vetores e Reservatórios da leishmania

Estudos patofisiológicos verificaram que a forma promastigota da leishmania se desenvolve no tubo intestinal do hospedeiro invertebrado (vetor), os quais são insetos flebotomíneos, conhecidos popularmente como mosquito palha, tatuquiras, birigui, entre outros (Brasil, 2006). Os flebotomíneos (Figura 3) são os únicos insetos vetores da leishmaniose. No velho mundo são reconhecidas como vetores espécies e subespécies do gênero *Phlebotomus* enquanto que no Novo Mundo espécies do gênero *Lutzomyia* figuram como principais vetores (OMS, 2010).



Figura 3: Fêmea de flebotomíneo adulto
Fonte: Brasil, 2006

No Brasil, duas espécies, até o momento, estão relacionadas com a transmissão da Leishmaniose Visceral, *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*. A primeira espécie é considerada a principal espécie transmissora da *L. (L.) chagasi* no Brasil. A *Lutzomyia longipalpis* adapta-se facilmente ao peridomicílio e a variadas temperaturas, podendo ser encontrada no interior dos domicílios e em abrigos de animais domésticos (Brasil, 2006).

Protozoários do gênero *Leishmania* são mantidos primariamente na natureza por populações de mamíferos silvestres e sinantrópicos. Eventualmente animais domésticos podem entrar no ciclo de transmissão desses parasitos, embora a infecção seja acidental, como no homem. Entre os hospedeiros silvestres dessas espécies de leishmania encontram-se roedores, marsupiais, primatas não-humanos e edentados. Animais domésticos tais como cães, gatos e equinos tem sido encontrados infectados por leishmanias causadoras da forma cutânea. Porém, existem vários relatos de infecção canina por *Leishmania chagasi* (Barral; Costa, 2011).

2.1.2 Ciclo Biológico da leishmania

Parasitas protozoários do gênero *Leishmania* têm um ciclo de vida que alterna entre hospedeiros reservatórios mamíferos e flebotomíneos hematófagos (vetores). O ciclo de vida dentro do intestino do vetor é complexo, e varia entre os subgêneros *Leishmania* e *Viannia*. No geral após o repasto sanguíneo são liberadas no intestino médio dos flebotomíneos formas amastigotas a partir da ingestão de macrófagos mamíferos infectados. Estes amastigotas transformam-se em formas promastigotas procíclicas proliferativas (Wilson et al, 2010).

As formas procíclicas se multiplicam e são capazes de aderir ao epitélio intestinal do flebotomíneo devido a um conjunto de glicoproteínas de membrana. A adesão propiciada por

essas moléculas impede que o parasito seja expelido com as excretas do flebotomíneo, após a digestão do sangue (Sacks; Kamhawi, 2001).

Através de um processo chamado metacicloênese que ocorre entre o sétimo e décimo dia após o repasto, as promastigotas procíclicas passam por mudanças morfológicas e fisiológicas no tubo digestório do vetor, e parte dessa população se diferencia em formas metacíclicas. Com este processo, ocorre uma mudança do perfil de moléculas citoplasmáticas e de membrana do parasito, o que possibilita a liberação das formas metacíclicas do tubo digestório do inseto vetor e as torna mais infectantes ao hospedeiro mamífero (Pimenta; Turco, 1992).

Os parasitos metacíclicos inoculados no mamífero pela picada do inseto vetor são inicialmente fagocitados por neutrófilos. Estas células destroem as leishmanias e secretam quimiocinas, substancias que recrutam novas células incluindo macrófagos que irão fagocitar outros promastigotas que aí sim irão ser internalizados no vacúolo parasitóforo, que logo se associa aos lisossomos, dando origem ao vacúolo fagolisossomal, onde o parasito permanece em um ambiente hostil, contendo enzimas. No entanto, devido a diversos mecanismos de evasão à resposta imune do hospedeiro, a leishmania se adapta e sobrevive neste ambiente, onde se multiplica, rompem a célula hospedeira e são fagocitadas por outros macrófagos (Peters et al., 2008; Sacks; Sher, 2002). O ciclo se completa com a ingestão pelo inseto vetor de novas formas amastigotas durante um novo repasto sanguíneo. (Figura 4).

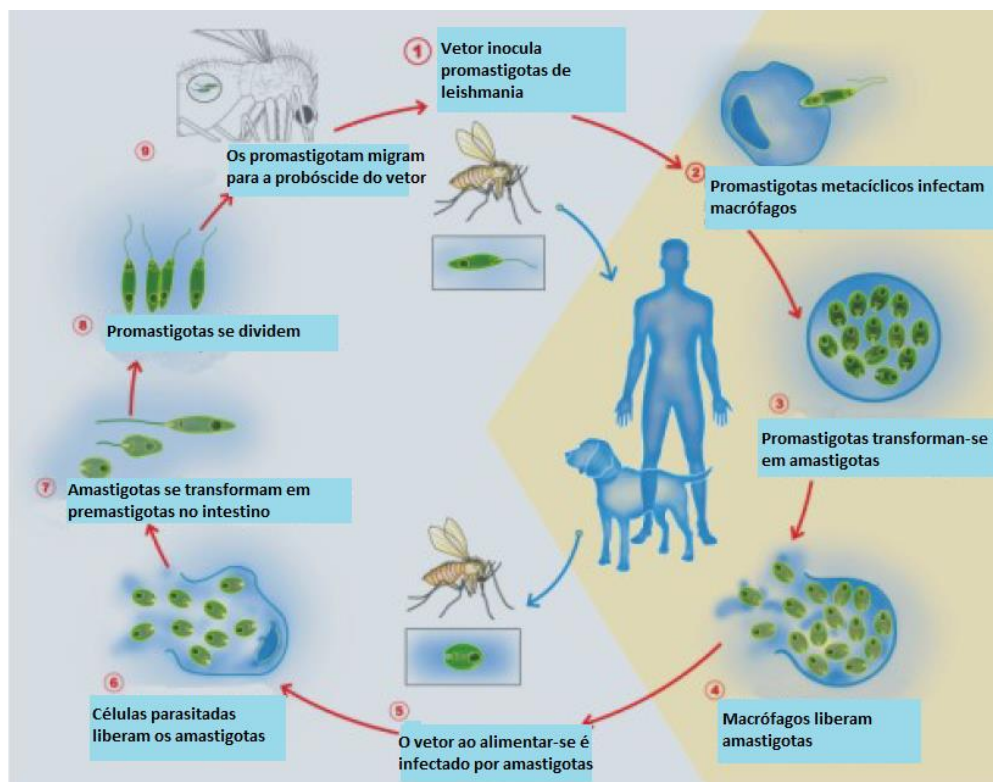


Figura 4: Ciclo de vida de *Leishmania* spp.

Fonte: Montalvo; Fraga; Monzote, 2012 com modificações

2.1.3 Leishmanioses

Gaspar Vianna, em 1909, no Instituto Oswaldo Cruz correlacionou lesões causadas por várias doenças com um protozoário do gênero *Leishmania*, o qual recebeu o nome de *Leishmania braziliensis*. Estas lesões eram chamadas de úlcera de Bauru, ferida brava, uta ou úlcera dechiclero (Rath, 2003).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as leishmanioses são consideradas antroponoses e integram o conjunto das seis doenças tropicais mais preocupantes no Velho Mundo e Américas, e constituem um crescente problema de saúde pública, não somente no Brasil, onde é considerada uma das endemias de interesse prioritário, como em grande parte dos continentes americano, asiático, europeu e africano (Costa, 2005).

O resultado da infecção por *Leishmania* em seres humanos depende em grande parte da capacidade de resposta imune do hospedeiro e da virulência da cepa do parasito infectante. Com isso, os protozoários deste gênero são capazes de produzir um largo espectro de doenças (Grimaldi; Tesh, 1993).

As leishmanioses podem se manifestar em duas formas principais denominadas Leishmaniose Visceral (LV) e Leishmaniose Tegumentar (LT). A manifestação clínica desta última forma varia de acordo com a interação entre o parasito e a resposta imune do hospedeiro e incluem as formas cutânea localizada (LCL), cutânea disseminada (LD) e cutânea difusa (LCD), além da forma mucosa (LM).

O acometimento Cutâneo pode ser causado por catorze espécies de *Leishmania*, entre as quais, a forma Difusa que é causada pela espécie *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e se caracteriza pela dificuldade no tratamento devido as lesões disseminadas não-ulcerativas, as quais não curam espontaneamente (Barral; Costa, 2011).

A forma mucocutânea causada principalmente por *Leishmania (Viannia) braziliensis*, é popularmente conhecida no Brasil por úlcera de Bauru ou ferida brava, pode causar extensa destruição das mucosas oral, nasal, laríngea e faríngea com consequentes lesões desfigurantes (Barral; Costa, 2011).

A leishmaniose visceral (LV) é uma parasitose do complexo *Leishmania donovani* que tem como agente etiológico as espécies, *Leishmania (Leishmania) chagasi*, *Leishmania (Leishmania) donovani* ou *Leishmania (Leishmania) infantum*, a depender da localização geográfica. Estudos realizados no Brasil identificaram a *Leishmania (Leishmania) chagasi* como a responsável pelos casos de leishmaniose visceral em todas as regiões brasileiras. Esta

espécie tem como hospedeiros naturais mamíferos de ambiente silvestre, as raposas e os marsupiais (Costa, 2005).

A infecção pela *L. (L.) chagasi* pode causar manifestações clínicas de intensidade variável. Os fatores que determinam a gravidade das manifestações clínicas podem estar relacionados com a idade, o estado nutricional e as características imunogenéticas do indivíduo. No período inicial, ocorre febre, hepatoesplenomegalia discreta e palidez cutâneo-mucosa. O período final da doença associa-se com infecções bacterianas e desnutrição proteico-energética grave (Brasil, 2011).

Dentre a diversidade de espécies do gênero *Leishmania* spp. destacam-se as listadas na Tabela 1, as quais se distribuem pela América Central e do Sul e causam manifestações clínicas no homem.

Tabela 1. Principais espécies de *Leishmania* patogênicas em humanos nas Américas.

Subgênero <i>Viannia</i>	Acometimento clínico	Distribuição geográfica
<i>Leishmania (V.) braziliensis</i>	Lesões cutâneas e mucosas	América Central e do Sul
<i>Leishmania (V.) peruviana</i>	Predominantemente lesões cutâneas	Peru
<i>Leishmania (V.) guyanensis</i>	Predominantemente lesões cutâneas	América do Sul
<i>Leishmania (V.) panamensis</i>	Predominantemente lesões cutâneas	América Central
<i>Leishmania (V.) shawi</i>	Lesões cutâneas	Região Amazônica
<i>Leishmania (V.) naiffi</i>	Lesões cutâneas	Região Amazônica
Subgênero <i>Leishmania</i>	Acometimento clínico	
<i>Leishmania (L.) mexicana</i>	Lesões cutâneas (eventualmente, cutâneo-difusas)	América Central
<i>Leishmania (L.) amazonensis</i>	Lesões cutâneas (eventualmente, cutâneo-difusas)	América do Sul
<i>Leishmania (L.) venezuelensis</i>	Lesões cutâneas	Venezuela
<i>Leishmania (L.) pifanoi</i>	Lesões cutâneas (eventualmente, cutâneo-difusas)	Venezuela
<i>Leishmania (L.) chagasi</i>	Forma visceral	América Central e do Sul

Fonte: Costa, 2005 com modificações

2.1.4 Epidemiologia das Leishmanioses

As leishmanioses ocorrem principalmente na África, Ásia e América Latina, e estão associadas à desnutrição, deslocamento da população, condições precárias de habitação, sistema imunológico deficiente, falta de recursos e mudanças ambientais, como desmatamento, construção de barragens, sistemas de irrigação e urbanização. Uma análise recente mostra que mais de 98 países e territórios são endêmicos para leishmaniose, com 1,3 milhões de novos casos anualmente entre eles 20 000 a 30 000 casos de morte. Estima-se uma ocorrência de cerca de 0,2 a 0,4 milhão de novos casos de LV e 0,7-1,2 milhões de novos casos de LC a cada ano em todo o mundo. Mais de 90% dos casos de LV globais ocorrem em seis países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão (Figura 5) (OMS, 2013).

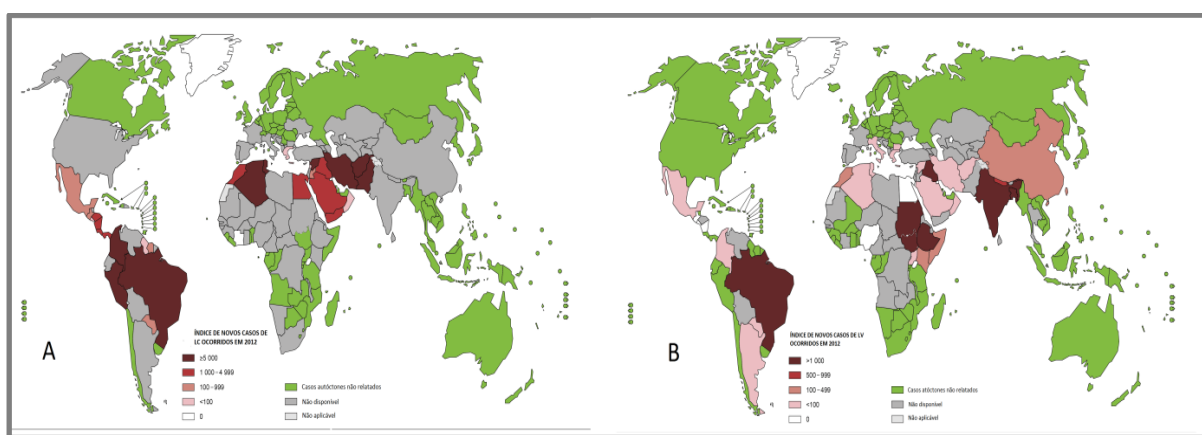


Figura 5: Índice de endemicidade da LC (A) e LV (B), a nível mundial em 2012.

Fonte: OMS, 2013

No período de 1988 a 2007, a Leishmaniose Cutânea (LC) no Brasil apresentou média anual de 27.736 casos autóctones. Ao longo desse período, observou-se uma tendência no crescimento da endemia, registrando os coeficientes mais elevados nos anos de 1994 e 1995, quando atingiram níveis de 22,83 e 22,94 casos por 100.000 habitantes, respectivamente. Observa-se uma expansão geográfica da doença no país. No início da década de 80, foram registrados casos autóctones em 19 unidades federadas e, no ano de 2003, foi confirmada autoctonia em todas as unidades federadas do país. A região Norte vem contribuindo com o maior número de casos (85,4 casos por 100.000 habitantes), seguida das regiões Nordeste (43,5 casos por 100.000 habitantes) e Centro-oeste (37,5 casos por 100.000 habitantes) (Brasil, 2010).

No Brasil, a leishmaniose visceral é uma doença endêmica, no entanto têm sido registrados surtos frequentes. A LV está distribuída em 21 unidades da federação, atingindo as cinco regiões brasileiras. De 2000 a 2010, a média anual de casos de LV foi de 3.379 casos. A

letalidade aumentou de 3,4%, em 1994, para 5,5%, em 2008, o que representou um incremento de 61,8%. A letalidade média de 2006 a 2010 foi 6,3%. A doença é mais frequente em menores de 10 anos (58%) e o sexo masculino é proporcionalmente o mais afetado (61%). Na década de 90, aproximadamente 90% dos casos notificados de LV ocorreram na região Nordeste (Brasil, 2010). Atualmente, apesar de estar distribuída em todo o território brasileiro, a região Nordeste concentra cerca da metade dos casos de LV do país (Góes, 2013).

No ano de 2009 o estado de Sergipe registrou 11 casos de LT e 39 casos de leishmaniose visceral. A letalidade foi de 7,7% e o percentual de cura clínica de 84,6%. Tiveram diagnóstico laboratorial, 87,2% dos casos. Foram confirmados casos em 17,3% dos municípios do estado, sendo que Aracaju correspondeu a 41% do total (Brasil, 2011).

Entre 2007 e 2011, foram notificados 128 novos casos de Leishmaniose Visceral (LV) no município de Aracaju, representando uma média anual de 25,6 casos. Entre os casos, houve predomínio do sexo masculino (65,6%). A idade variou de sete meses a 69 anos, com média de 21,7. A maior concentração de casos ocorreu em crianças de até quatro anos (26,6%), havendo distribuição semelhante nas demais faixas etárias (Góes, 2014).

2.1.5 Quimioterapia da leishmaniose

O nome de Gaspar Viana tem importância não apenas nas contribuições taxonômicas em separar a *Leishmania brasiliensis* das outras espécies, mas por ter sido o primeiro a usar os antimoniais sob a forma trivalente no tratamento da LC, em 1912, (Hamann, 1989).

Em 1920 foi produzido por Bramachari um antimonial na sua forma pentavalente. Considerado de maior segurança quando comparado aos antimoniais trivalentes, o antimônio pentavalente tem sido utilizado como fármaco de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses em muitos países, incluindo o Brasil.

As leishmanioses há muitas décadas são tratadas em quatro semanas com injeções de agentes de antimônio pentavalente. A anfotericina B passou a ser utilizada como o agente secundário em 1997, a anfotericina B lipossomal foi licenciada nos Estados Unidos e em outros países para esta indicação. Embora a anfotericina B lipossomal seja mais eficaz e geralmente bem tolerada, ela e as outras novas formulações lipídicas de anfotericina B são agentes parenterais. Outra formulação para a leishmaniose é a miltefosina, um análogo a fosfocolina que interfere nas vias de sinalização celulares, mas com eficácia clínica variável contra lesões quando administrados por via oral (Meyerhoff, 1999).

Os compostos utilizados atualmente como tratamentos de primeira escolha e ensaios clínicos (Tabela 2) para as leishmanioses incluem: Antimônio pentavalente: usado para LV e LC por mais de 60 anos, apresenta cardiotoxicidade, e exige um tratamento parenteral de 30 dias para LV. A Anfotericina B desoxicolato: tratamento de primeira linha para LV em áreas com ausência de resposta aos antimoniais exige necessidade de hospitalização e exibe toxicidade limitante da dose. A Anfotericina B lipossomal, é muito mais seguro e altamente eficaz, no entanto, possui um custo elevado. A Miltefosina: medicamento oral, custo elevado, exige tratamento de 28 dias, risco de resistência e contra-indicação para gestantes. E a Paromomicina: baixo custo de formulação parentérica, requer 3 semanas de dolorosa administração intramuscular e está associada com insuficiência renal (DNDi, 2013).

Tabela 2: Atuais compostos utilizados para o tratamento da leishmaniose (Croft, 2006).

LEISHMANIOSE VISVERAL	
Primeira linha	estibogluconato de sódio (Pentostam) antimoniato de meglumina (Glucantime) Anfotericina B (Fungizone) anfotericina B lipossomal (AmBisome) Pentamidina
Ensaio clínico	Miltefosina (oral, Fase IV; registrado na Índia) Paromomicina (Fase III) Sitamaquine (por via oral, a fase II) Outras formulações de anfotericina B
LEISHMANIOSE CUTÂNEA	
Primeira linha	estibogluconato de sódio (Pentostam) antimoniato de meglumina (Glucantime) Anfotericina B (Fungizone) Pentamidina Paromomicina (formulações tópicas com cloreto metilbenzetônio ou uréia)
Ensaio clínico	Miltefosina (oral, Fase III, registrado na Colômbia) Paromomicina (formulação tópica com gentamicina e surfactantes, Fase II) Anti-fúngicos - cetoconazol, fluconazol, itraconazol

A Organização Mundial de Saúde (OMS 2010) recomenda que a leishmaniose visceral seja tratada com combinação de medicamentos ao invés de monoterapia. Porém, desde 2009 foi recomendado que anfotericina B lipossomal seja utilizada como estratégia provisória até que as combinações possam ser implementadas.

Neste contexto, há uma intensa busca de novos potenciais compostos sintéticos e naturais para o tratamento da leishmaniose. Marcucci; Ferreres; Garci (2001) e Banskota et al. (2000) apontaram que a própolis tem um grande potencial para o desenvolvimento de novos fármacos. A própolis tem sido amplamente utilizada na medicina popular e tem mostrado resultados promissores contra algumas protozooses (Cunha et al., 2011).

2.2 Terapêuticos Naturais

Há muitos anos o homem vem utilizando os recursos da flora no tratamento de diversas patologias. Foi por meio da observação e da experimentação, que as propriedades terapêuticas de determinadas plantas foram sendo descobertas e propagadas de geração em geração, fazendo parte da cultura popular (Tuolla; Nascimento, 2006).

A atividade biológica de extratos de plantas tem sido atribuída aos compostos que pertencem a diferentes grupos químicos, incluindo alcalóides, flavonóides, fenilpropanóides, esteróides e terpenóides. Para obter um remédio fitoterápico ou um composto ativo isolado, diferentes estratégias de pesquisa podem ser utilizadas, entre elas, investigação do uso tradicional, a composição química, a toxicidade das plantas, ou a combinação de vários critérios (Tiuman et al., 2011).

Os produtos naturais têm desempenhado um importante papel na descoberta de novos fármacos. A propagação da resistência antimicrobiana e algumas limitações de novas drogas têm levado as atenções para terapia natural para o tratamento de várias doenças. Entre os compostos naturais, a própolis tem sido considerada como um dos compostos mais promissores, com várias propriedades farmacológicas (Newton et al., 2002).

2.3 Própolis Vermelha e sua origem botânica

A própolis é uma mistura de resina natural produzida pelas abelhas a partir de substâncias coletadas de partes de plantas, brotos, e exsudato. A palavra própolis é derivado do grego, em que Pro significa "na entrada" e polis "comunidade" ou "cidade". Este produto natural é usado na defesa da colmeia. As abelhas utilizam a própolis na construção e reparação de suas colmeias para vedar aberturas e rachaduras, suavizar as paredes internas e proteger contra a entrada de microrganismos (Burdock, 1998; Bankova et al., 2005).

Como a mais importante “arma química” das abelhas contra micro-organismos patogênicos, a própolis tem sido usada como terapêutico por seres humanos desde os tempos antigos. Ela ainda é um dos terapêuticos mais frequentemente utilizados nos estados dos

Balcãs, aplicados para o tratamento de feridas e queimaduras, dor de garganta, úlcera de estômago, entre outros (Bankova, 2005).

Em países de clima temperado, segundo Nogueira et al (2007), são poucas as plantas que produzem essa resina apícola, mas no Brasil há uma grande variedade delas. A Própolis brasileira está classificada em diferentes grupos com base em características físico-químicas e características botânicas.

A padronização das amostras de própolis faz-se importante no controle de qualidade e efetiva aplicação terapêutica. Esta padronização é determinada pela origem geográfica e, principalmente, pela origem botânica aliada à fenologia da planta hospedeira (Alencar, 2005).

Foram relatados as principais origens botânicas de tipos de própolis das regiões Sul, Sudeste e Nordeste como materiais resinosos de *Populus alba* (Salicaceae), *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) e *Hyptis divaricata* (Lamiaceae) respectivamente (Park; Alencar; Aguiar, 2002; Silva et al., 2008).

A própolis brasileira tem sido amplamente estudada para elucidar suas várias propriedades biológicas. Assim, atualmente, 13 tipos de própolis brasileira foram caracterizadas e classificadas em tipos 1-13 (Park et al., 2002).

A própolis, mais popular e bem estudada é chamada própolis verde (Figura 6B), que tem origem da *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae), amplamente distribuída nas Regiões Sudeste e Sul do Brasil (Park et al, 2002; Salatino et al, 2011). A própolis vermelha brasileira (Figura 6A), classificada como o 13º tipo de própolis, apresenta uma coloração vermelha intensa, além de uma composição química distinta dos outros 12 tipos de própolis brasileira (Alencar et al., 2007). O perfil químico da própolis vermelha brasileira é constituído por isoflavonóides ao contrário de amostras de própolis vermelha da Venezuela onde foram encontrados isoprenilados e benzofenonas como compostos majoritários (Tomas-Barberán et al., 1993). A própolis vermelha típica de Cuba cuja fonte é a resina de *Clusia rosea*, também difere da variedade brasileira (Hernandez et al., 2005).

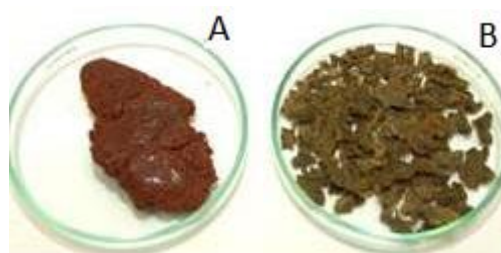


Figura 6: Amostras da própolis vermelha (A) e própolis verde (B)
Fonte: Park; Carlos; Júnior, 2011

A própolis vermelha é o tipo de própolis com identificação mais recente. Abelhas (*Apis mellifera L.*) foram observadas coletando exsudatos resinosos avermelhados sobre a superfície da leguminosa *Dalbergia ecastophyllum* e posteriores análises da composição química desta espécie, confirmaram a origem botânica da própolis vermelha (Daugusch et al., 2008; Franchi et al, 2012; Piccinelli et al, 2011; Silva et al, 2008; Lopéz, 2014).

Dalbergia ecastophyllum (Fabaceae) (Figura 7), popularmente conhecida como rabo-de-bugio é encontrada ao longo da praia e região de mangue do nordeste do Brasil (Daugusch et al. 2008). Esta espécie pode ser encontrada no município de Brejo Grande, Sergipe, nas proximidades de apiários da região, onde foram identificadas própolis de cor vermelha utilizada neste estudo.



Figura 7: *Dalbergia ecastophyllum*, origem botânica da própolis vermelha

Dentre os principais constituintes químicos já relatados para *D. ecastophyllum* destacam-se os isoflavonoides: liquiritigenina, daidzeína, isoliquiritigenina, formononetina, biochanin A e medicarpina (DAUGSCH et al. 2008; SILVA et al., 2008).

O efeito bactericida e fungicida natural da própolis torna este produto imprescindível para preservar a vida na colmeia, com isso Buriol et al., (2009), afirmaram que a própolis apresenta atividade antimicrobiana independente da sua origem. Embora seja um produto de origem animal, alguns compostos químicos da própolis são derivados da fonte botânica utilizada pelas abelhas, principalmente aqueles com ação biológica (SALATINO et al., 2005).

Baseado neste efeito natural da própolis, mais de 300 compostos já foram identificados até agora a partir de diferentes amostras (Lustosa et al, 2008), incluindo ácidos fenólicos, flavonoides, ésteres, diterpenos, sesquiterpenos, lignanas, aldeídos aromáticos,

álcoois, aminoácidos, ácidos graxos, vitaminas e minerais. Dentre essas classes de substâncias, destacam-se a dos flavonoides e a dos ácidos fenólicos, pois é atribuída a elas grande parte das atividades biológicas constatadas para a própolis (Funari; Ferro, 2006).

Flavonóides são relatados como os mais abundantes e efetivos antioxidantes na própolis. Existe uma correlação entre o alto conteúdo de flavonoides totais e a atividade anti-radicaais livres em extratos de própolis da Argentina (Ahn et al., 2007). Os flavonoides desempenham importante papel na atividade antioxidante de extratos de própolis brasileira, mas outros fatores podem estar envolvidos (Lustosa, 2008).

A maioria dos flavonoides e fenólicos identificados na própolis já possuem atividade biológica comprovada. Dentre as propriedades estão às atividades: antimicrobiana, antioxidante, antiinflamatória, imunomodulatória, hipotensiva, cicatrizante, anestésica, anticâncer, anti-HIV e anticariogênica (Park et al., 2002). Alguns estudos também evidenciam a ação da própolis como antileishmanicida (Silva et al., 2013; Ayres; Marcucci; Giorgio, 2007; Pontin, 2008), e ação hormonal (Song et al., 2002).

No estudo de Frozza et al. (2013) é mostrado que o extrato de própolis vermelha de Sergipe é caracterizada por uma mistura complexa de compostos químicos semelhantes à própolis vermelha encontrada em outras regiões do nordeste do Brasil. A composição química de extratos de própolis vermelha da região Nordeste tem sido amplamente caracterizada por vários estudos recentes, a maioria deles descreve componentes similares, incluindo os principais compostos investigados.

A própolis vermelha apresenta alta concentração de ácidos fenólicos e flavonoides, sendo as isoflavonas formononetina e biochanina A como os componentes majoritários (Awale et al., 2008; Franchi et al., 2012; Piccinelli et al., 2011).

Extrato hidroalcoólico obtido a partir de própolis vermelha apresenta alto conteúdo de polifenóis. Os polifenóis são parte do produto químico encontrado na composição da própolis vermelha que varia de acordo com o ano e local da coleta. Extratos retirados do nordeste brasileiro revelaram diferentes quantidades de polifenóis. Esta diferença é possível devido aos diferentes métodos de extração, ao lado da localização geográfica (Frozza et al., 2013).

Além das diferenças na composição química dos outros tipos de própolis já identificados, Franchi et al. (2012) relataram que a própolis vermelha é mais citotóxica do que o tipo verde em linhas celulares de leucemia.

2.4 Atividade leishmanicida da Própolis

Recentemente alguns pesquisadores têm demonstrado o efeito leishmanicida de diferentes extratos da própolis *in vitro* e *in vivo*.

Duran et al. (2008), analisaram a atividade *in vitro* da própolis contra promastigotas de cinco isolados clínicos de *Leishmania tropica*. Seus resultados demonstraram que o crescimento dos parasitas foi significativamente inibido pela própolis nas concentrações de 250, 500, e 750 µg/ml.

Ayres; Marcucci; Giorgio (2007) investigaram o efeito de amostras de própolis coletadas no Estado de Alagoas (própolis vermelha) e no Paraná (Própolis verde) sobre formas promastigotas e amastigotas da espécie *L. (L.) amazonensis* obtidas de lesões. Todas as amostras de própolis verde e vermelha avaliadas neste estudo foram capazes de reduzir a carga parasitária, monitorada pelo percentual de células infectadas e o número de parasitas intracelulares. Em contrapartida concentrações superiores a 25 µg/ml dos extratos de própolis verde foram tóxicos para os macrófagos. No entanto o extrato da própolis vermelha induziu um aumento na atividade dos macrófagos sem causar alterações morfológicas nas concentrações 25 ou 50 µg/ml. Embora a própolis vermelha tenha sido mais ativa para o parasita intracelular, esta não apresentou nenhum efeito direto sobre promastigotas ou amastigotas axênicos.

O trabalho de Ferreira et al. (2014) relata os efeitos de extratos de própolis verde (WEP) coletadas em Minas Gerais, em um modelo murino de leishmaniose visceral causada por *L. infantum*. Neste estudo o WEP foi avaliado por si só ou em combinação com uma formulação lipossomal de antimoniato de meglumina (MA). Os resultados demonstraram o potencial do WEP na redução da carga parasitária no fígado. No entanto, a associação de WEP e MA lipossomal não foi capaz de aumentar o efeito leishmanicida e as alterações do tecido em comparação para os tratamentos individuais.

Na avaliação das propriedades leishmanicidas de própolis coletada no estado de São Paulo, em promastigotas de *L. braziliensis*, Silva et al. (2013) observaram uma inibição da proliferação dos parasitos utilizando 100 µg/ml do extrato de própolis durante 24 horas. Além disso, alterações morfológicas nas promastigotas puderam ser observadas após 2 horas de tratamento.

Diante de toda a problemática em relação ao tratamento da leishmaniose, o interesse pela pesquisa de novas substâncias com atividade biológica sobre a leishmania vem sendo ampliado com o intuito de obtenção de novos compostos capazes de atuarem sobre o parasito, porém desprovidos dos graves efeitos colaterais (Pontin, 2003). Em relação aos trabalhos

citados anteriormente, a própolis vem apresentando resultados satisfatórios nas leishmanioses e em grande parte com baixo teor citotóxico as células humanas.

3 OBJETIVO GERAL

- Avaliar o perfil químico e os efeitos leishmanicidas *in vitro* de extratos da própolis vermelha e *Dalbergia ecastophyllum* em formas promastigotas de *Leishmania chagasi* e *Leishmania amazonensis*.

3.1 Objetivos Específicos

- Identificar a composição fenólica e confirmar a origem botânica de extratos hidroetanólicos da própolis vermelha coletada na região do Baixo São Francisco, SE;
- Avaliar o efeito leishmanicida dos extratos hidroetanólicos da própolis vermelha e *D. ecastophyllum* em promastigotas de *L. chagasi* e *L. amazonensis*;
- Avaliar efeitos citotóxicos da própolis vermelha em macrófagos humanos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras de própolis e *Dalbergia ecastophyllum*

As amostras de própolis vermelha e *Dalbergia ecastophyllum* foram coletadas no município de Brejo Grande (S 10°28'25" e W 36°26'12") localizado na região do baixo São Francisco em Sergipe, Brasil (Figura 8). A própolis de coloração vermelha foi coletada da parte interna e frestas da tampa de caixas racionais de abelhas *Apis mellifera* (modelo Langstroth) (Figura 9).

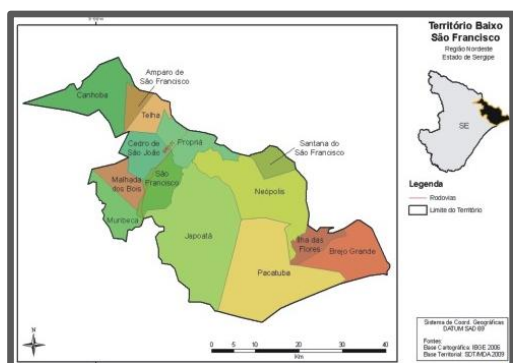


Figura 8: Território do baixo São Francisco em Sergipe



Figura 9: Própolis em caixa racional de abelhas

Nas proximidades dos apiários foram coletadas amostras de entrecascas e ramos florais da principal fonte botânica da própolis vermelha, a espécie *Dalbergia ecastophyllum*. As exsicatas de *D. ecastophyllum* foram depositadas por Yzila Liziane Farias Maia de Araújo com o número de registro 19310 no Herbário ASE da Universidade Federal de Sergipe

4.2 Obtenção dos extratos

4.2.1 Extrato Hidroetanólico da Própolis Vermelha (EHPV)

O material apícola, 1g de própolis vermelha, foi macerado e extraído com etanol 70% (12,5mL) à temperatura ambiente durante 1 hora em banho de ultrassom. Em seguida foi centrifugado a 3.000 rpm durante 5 minutos à 24°C e o extrato obtido foi concentrado por evaporação a temperatura ambiente durante 48h para o solvente ser totalmente eliminado. (Maia-Araújo, 2011 com modificações).

4.2.2 Extrato Hidroetanólico de *Dalbergia ecastophyllum* (EHDe)

Entrecascas (1,5 Kg) da espécie *Dalbergia ecastophyllum* foram submetidas à secagem em estufa de circulação forçada de ar a 40°C, no Laboratório de Química de Produtos Naturais e Bioquímica/Departamento de Fisiologia/UFS, até sua completa desidratação. Em seguida, as entrecascas foram reduzidas a pó utilizando-se um moinho de facas. O material obtido foi submerso em etanol 90% e mantido à temperatura ambiente durante cinco dias. Após este período, o material foi filtrado e concentrado em evaporador rotativo (LG LOGEN) a 60°C e pressão reduzida de 700 mmHg.

O rendimento dos extratos foi calculado pela razão da massa seca dos extratos obtidos e a massa fresca da própolis vermelha e entrecascas de *Dalbergia ecastophyllum* e o resultado multiplicado por 100.

4.3 Caracterização química dos extratos da Própolis Vermelha e *Dalbergia ecastophyllum*

As análises foram feitas por Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR). Os experimentos foram realizados no Laboratório de Análises de Compostos Orgânicos Poluentes – LCP (Departamento de Química - UFS), supervisionado pela Prof^a Dra. Lisiane dos Santos Freitas. As análises foram realizadas de acordo com o método descrito por Alencar et al. (2007), com modificações. Os extratos passaram por uma pré-coluna cromatográfica para remoção de hidrocarbonetos, proteínas e carboidratos. Na coluna foram adicionados 5g de resina Ambelit XAD-2 para reter os compostos fenólicos dos extratos. O método de CLAE consistiu em adicionar 20µL do extrato da planta ou da própolis em uma coluna analítica Phenomenex (Luna 5u C18(2) 100A, 250x4,6mm) instalada em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (Shimadzu Co.) modelo Prominence composto por sistema binário de bombas (LC-20AT) desgaseificador por hélio (DGU-20A3) e forno de colunas (CTO-20A) com temperatura de 35°C. A fase móvel utilizada foi água/ácido fórmico (19:1 v/v) (solvente A) e metanol grau HPLC (solvente B). A vazão foi de 1,0 mL/min. O gradiente aplicado foi 10% do solvente B até 55% em 40min, 55% do solvente B em 46min, 75% do solvente B em 60min, 75% do solvente B em 65min, 10% do solvente B em 68min e 10% do solvente B em 70min. O tempo de corrida foi 70 minutos. As substâncias foram determinadas pela comparação com os espectros dos padrões na região ultravioleta de 190 a 450nm obtidos por meio do detector de arranjo de diodos (SPD-M 20A).

Os compostos padrões utilizados foram: ácido abscísico, ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido ferúlico, ácido p-cumarico, ácido protocateicico, ácido trans-cinâmico, ácido vanílico, apigenina, biochanina A, formononetina, isoliquiritigenina, kaempferol, luteolina, naringenina, quercetina, rutina e triacetina, todos adquiridos Sigma-Aldrich (Sigma, St. Louis, MO, EUA).

4.4 Culturas de *Leishmania*

Os isolados de *Leishmania chagasi* e *Leishmania amazonensis* foram obtidos do criobanco de leishmanias do Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Medicina da UFS. As culturas foram mantidas no laboratório de Biologia Celular e Molecular de Leishmanias (DMO-UFS) em estufa BOD (Biological Oxygen Demand) a 24°C, em meio Schneider (Sigma, St. Louis, MO, EUA) completo, ou seja, suplementado com soro bovino fetal 10% (Cripion, Brasil), ampicilina (1%) e gentamicina (0,1%) (Sigma, St. Louis, MO, EUA). A curva de crescimento parasitária foi obtida a partir da contagem diária de parasitas em cultura durante sete dias. Os promastigotas em fase exponencial de crescimento foram utilizados para os ensaios de atividade leishmanicida dos extratos.

4.5 Viabilidade *in vitro* sobre formas promastigotas

Formas promastigotas de *L. chagasi* e *L. amazonensis* em fase de crescimento exponencial foram utilizadas para os experimentos. As promastigotas foram contadas em hemocitômetro, ajustando-se a concentração dos parasitos para 1×10^6 parasitos/mL com meio Schneider completo. Todos os compostos foram testados em triplicata e foi utilizado como controle positivo a droga de referência Antimônio trivalente (Sb^{III}). Como controle negativo, as culturas passaram por todos os procedimentos, porém, foram mantidas em meio Schneider sem adição dos extratos.

As avaliações foram realizadas em microplacas contendo 96 poços, sendo em cada um adicionados 100µL dos extratos, diluídos em meio Schneider nas concentrações citadas na Tabela 3, e 100µL da cultura de promastigotas. As placas foram incubadas em estufa B.O.D. a 24°C por 24 horas.

Tabela 3: Distribuição das concentrações ($\mu\text{g/mL}$) dos extratos utilizados para os experimentos de viabilidade em promastigotas de *L. chagasi* e *L. amazonensis*

Extratos – espécie	Concentrações ($\mu\text{g/mL}$)									
Própolis vermelha – <i>L. chagasi</i>	10	20	30	40	50	60	70	80	90	
Própolis vermelha – <i>L. amazonensis</i>	5	10	20	30	40	50	60	70	80	
<i>Dalbergia</i> <i>ecastophyllum</i> – <i>L.</i> <i>amazonensis</i> e <i>L.</i> <i>chagasi</i>	25	50	100	250	400	550	700	850	1000	

Durante o período de incubação, as placas foram inspecionadas sob microscópio invertido e ao final das 24 horas foram adicionados a cada poço 50 μL de solução de resazurina (3mM). Em seguida as placas foram mais uma vez incubadas a 24°C e, após um período de 12 horas as absorbâncias foram lidas em leitor de microplacas nos comprimentos de onda 570 e 595nm. As absorbâncias obtidas pela leitura das placas foram utilizadas para o cálculo da viabilidade celular dos tratamentos com base na seguinte equação:

$$\% \text{ de viabilidade} = \frac{(\text{Absorbância } 570 \text{ nm} - (\text{Absorbância } 595\text{nm} \times \text{RO})_{\text{teste}})}{(\text{Absorbância } 570 \text{ nm} - (\text{Absorbância } 595\text{nm} \times \text{RO})_{\text{controle}}} \times 100$$

Os valores de IC_{50} foram obtidos pela regressão não linear da curva sigmoideal de inibição do crescimento.

4.6 Citotoxicidade dos extratos frente a Macrófagos Humanos

O efeito do extrato da própolis vermelha sobre a viabilidade dos macrófagos foi avaliada pelo ensaio de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazolil]-2,5-difeniltetrazólio). Segundo Monteiro, (2013) nesse método, o MTT é reduzido, por desidrogenases mitocondriais das células metabolicamente ativas, em cristais de formazan, de coloração púrpura.

Na avaliação citotóxica da própolis foram utilizados macrófagos humanos da linhagem J774. Foram utilizadas microplacas de 96 poços, nas quais, em cada poço de tratamento foram adicionados 200 μL de macrófagos (2×10^4 células/mL) em RPMI suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal e 2% da combinação estreptomicina (5mg/mL) e penicilina (5000 unidades) (Sigma St. Louis, MO, EUA). As culturas foram mantidas em estufa de circulação de ar a 37°C com 5% de dióxido de carbono (CO_2) durante 24h. Após este período todo o

meio foi retirado dos poços, mantendo os macrófagos aderidos ao fundo, e foram adicionados 200 µl do extrato da própolis vermelha (previamente filtrado em membrana 0,22µm) nas concentrações 40, 60, 80, 100, 120, 140 e 160 µg/mL. As placas foram incubadas durante 24h a 37°C e 5% de CO₂. As células crescendo em meio sem adição do extrato foram usadas como controle de vida, correspondendo a 100% de viabilidade.

Após a incubação, as células foram lavadas duas vezes com PBS estéril, e foram adicionados 200 µl da solução de MTT em cada poço e as placas foram novamente incubadas a 37°C e 5% de CO₂ por 3h. Após este período foram adicionados 100 µL de DMSO em cada poço afim de precipitar o formazan derivado da redução do MTT pelas hidrogenases mitocondriais das células que sobreviveram ao tratamento. A quantificação do formazan acumulado foi feita pela leitura da placa em espectrofotômetro a 570 nm. A concentração citotóxica 50% (CC₅₀) foi determinada por análise de regressão utilizando o programa GraphPrism. O índice de seletividade foi determinado pela razão entre a CC₅₀ obtida nos macrófagos e a IC₅₀ nos parasitas. Cada ensaio foi realizado em triplicatas, em três experimentos independentes

4.7 Análise estatística

Os resultados obtidos neste estudo foram analisados utilizando os programas Graph Pad Prism 4.0 e Microsoft Excel 2010. Os valores das IC₅₀, e CC₅₀ foram obtidos por análise de regressão. Para a plotagem dos pontos, foram utilizados os valores das médias e desvios padrão obtidos de triplicatas realizadas para cada um dos testes.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização fenólica dos extratos hidroetanólicos da própolis vermelha (EHPV) e de *Dalbergia ecastophyllum* (EHDe)

A obtenção de extratos naturais depende do método utilizado na extração. O etanol é o solvente apropriado para a maioria das preparações farmacêuticas nas concentrações de 70-80%, o que torna as soluções mais límpidas e densas (Fontana et al., 2004).

Neste estudo a preparação dos extratos hidroetanólicos (70%) tiveram um rendimento em massa seca da própolis vermelha e *Dalbergia ecastophyllum* respectivamente de 10 e 3,65%. (Tabela 4). Cabral et al. (2009), em estudo realizado com própolis vermelha indicam variações nos rendimentos em extratos fracionados, em que foram obtidos na fração hexânica (fr-Hex) e fração clorofórmica (fr-Clo) rendimentos de 11,36 e 30,08% respectivamente.

Tabela 4: Rendimento dos extratos hidroetanólicos da própolis vermelha e da entrecasca de *Dalbergia ecastophyllum*.

Extratos	Massa fresca (g)	Extrato obtido (g)	Rendimento (%)
Própolis vermelha	2	0.20	10
<i>D. ecastophyllum</i>	1150	42	3,65

São recentes os estudos com a Própolis vermelha proveniente da região Nordeste do Brasil, principalmente as amostras obtidas em Brejo Grande, município situado no estado de Sergipe. A publicação de Frozza et al. (2013), foi pioneira em abordar a composição química da própolis de Sergipe, além de sua atividade antioxidante e efeito citotóxico contra células cancerígenas.

Os compostos fenólicos são comumente encontrados em plantas comestíveis e não comestíveis, e têm sido relatados para vários efeitos biológicos. A própolis contém uma grande variedade de compostos fenólicos, principalmente flavonóides. Variação no teor de flavonóides da própolis é principalmente atribuível à diferenças nas plantas regionais utilizadas pelas abelhas para coletar as resinas (Kahkonen et al., 1999). Um dos componentes encontrados com frequência em própolis vermelha do Nordeste são os compostos fenólicos, caracterizados como contendo uma, ou mais, hidroxilas ligadas a um anel benzênico, sendo, neste último caso, denominados polifenóis. Embora contenha um grupo característico de álcoois, esta classe de compostos possui propriedades especiais, são compostos mais ácidos que os álcoois sendo oxidados com maior facilidade (Archela; Dall'Antonia, 2013).

As composições químicas dos extratos hidroetanólicos da própolis vermelha e *Dalbergia ecastophyllum* deste estudo foram analisadas por Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) e a identificação dos compostos químicos foi realizada pela comparação direta com padrões autênticos, que foram selecionados a partir da revisão de relatos científicos dos compostos fenólicos mais comumente encontrados em outras amostras da própolis vermelha e *Dalbergia ecastophyllum*.

Conforme apresentado nos cromatogramas da Figura 10A, no extrato da própolis vermelha foram identificados quatro flavonoides: Rutina, Isoliquiritigenina, Formononetina e Biochanina A. Estes resultados demonstram similaridade com o conteúdo fenólico dos estudos anteriormente realizados com a própolis vermelha de Sergipe, os quais relataram alta concentração de flavonoides, tais como pinocembrina, formononetina, isoliquiritigenina, liquiritigenina, medicarpina, e biochanina A (Frezza et al., 2013; López et al., 2014).

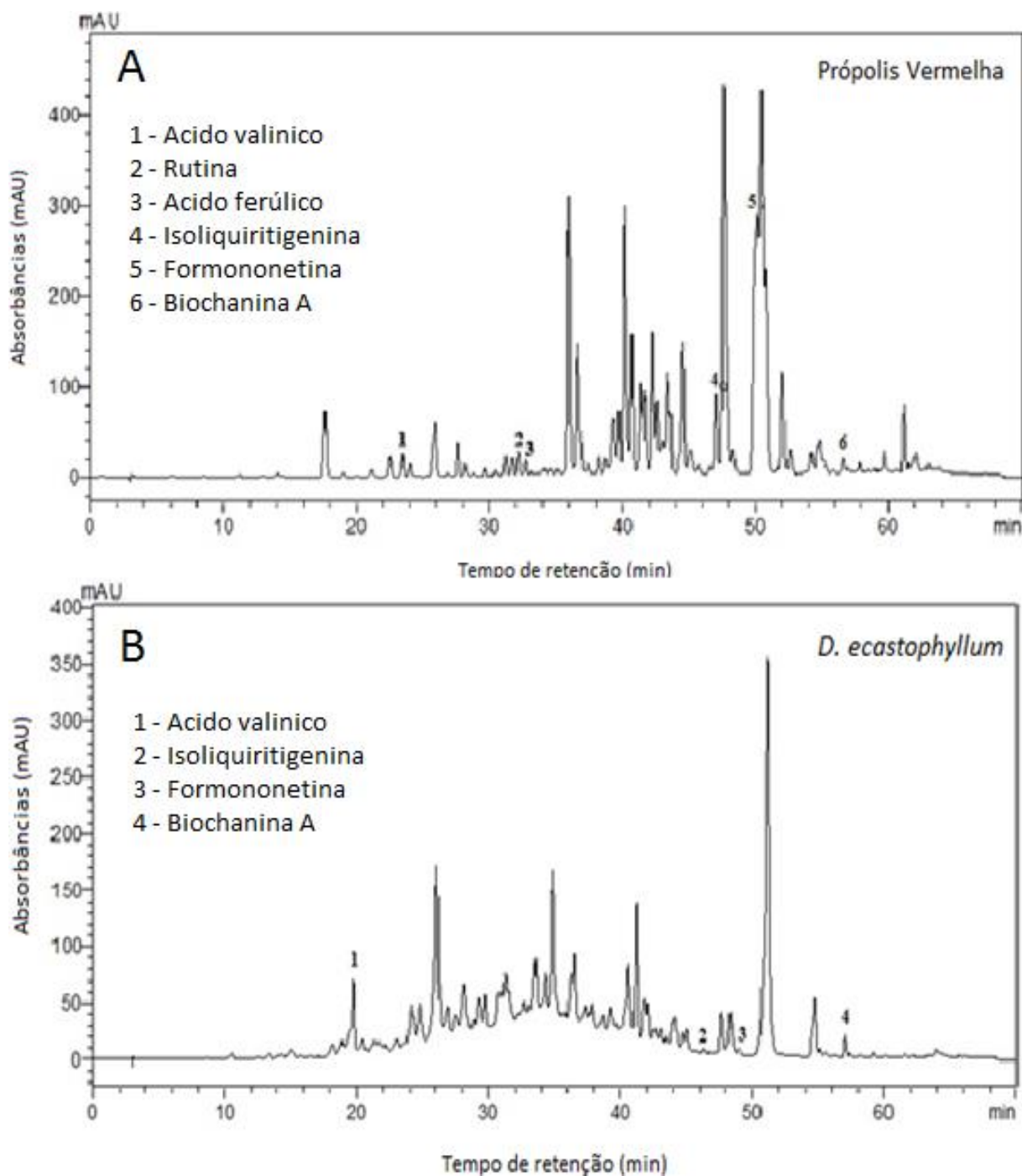


Figura 10: Cromatogramas obtidos por Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) dos extratos hidroetanólicos da Própolis Vermelha (A) e de *D. ecastophyllum* (B).

Além dos flavonoides já descritos também foram identificados no presente estudo como componentes do EHPV dois ácidos fenólicos: o ácido vanílico e o ácido ferúlico (Figura 10A). Este último já foi identificado na composição da própolis vermelha nos trabalhos de Silva et al. (2008) e Franchi et al. (2012). Em outras regiões do nordeste brasileiro, principalmente no estado de Alagoas, a composição química e atividade biológica da própolis já foram avaliadas por vários estudos, a maioria deles descreve componentes

semelhantes, incluindo os principais compostos aqui relatados (Cabral et al., 2009; Franchi et al., 2012; Kamiya et al., 2012; Piccinelli et al., 2011).

Dos seis compostos fenólicos identificados neste estudo como componentes do extrato da própolis vermelha, quatro encontram-se presentes também no extrato de *Dalbergia ecastophyllum*. São eles um ácido fenólico: o ácido valínico e três flavonoides: Isoliquiritigenina, Formononetina e Biochanina A (Figura 10B). As estruturas químicas dos compostos fenólicos encontrados no extrato de própolis vermelha e *D. ecastophyllum* avaliados neste estudo estão representadas na Figura 11.

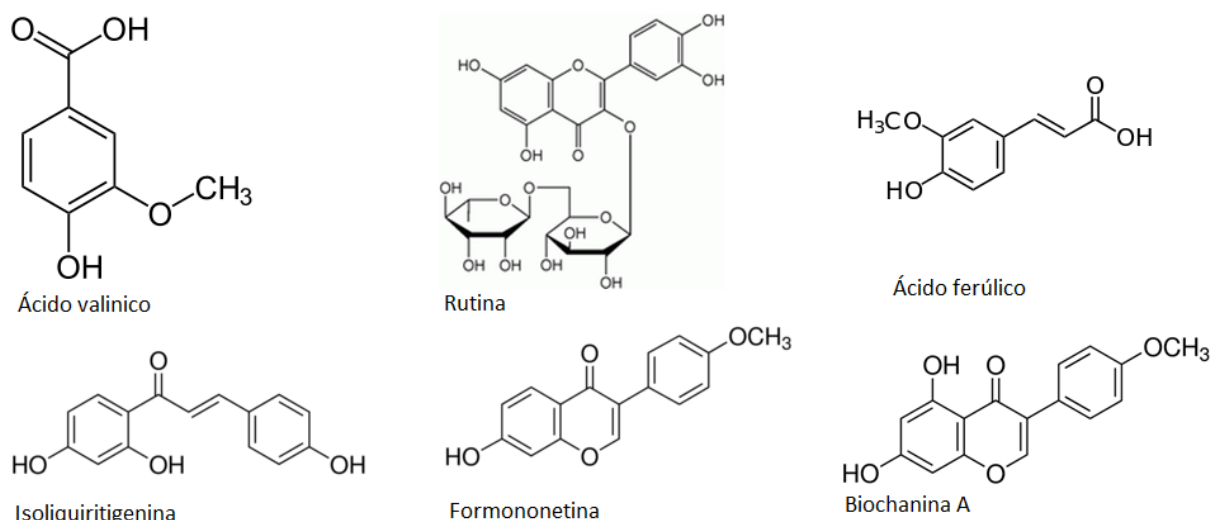


Figura 11: Estrutura química dos compostos fenólicos encontrados nos extratos.

No estudo publicado por Dausch; Moraes & Park (2007) os perfis cromatográficos da própolis vermelha também foram semelhantes aos de *D. ecastophyllum*, e os resultados indicaram a origem botânica da própolis em comparações quantitativas de flavonoides e outras substâncias químicas. López et al., (2014) identificaram a biochanina A, formononetina e pinocembrina como os três marcadores para evidenciar a presença de resinas de *D. ecastophyllum* na própolis vermelha.

Assim como ocorreu na região de coleta deste trabalho, Franchi et al. (2012) observaram que as abelhas das colmeias localizadas ao longo da costa do nordeste brasileiro, visitavam a leguminosa *Dalbergia ecastophyllum* para recolher os exsudatos resinosos vermelhos em sua superfície, e dos orifícios nos ramos para produzir a própolis vermelha. Tomadas em conjunto estas evidências demonstram que a própolis aqui relatada tem como principal origem botânica a espécie *D. ecastophyllum*, sendo esta variedade de própolis em estudo, a mesma encontrada em outras localidades da região nordeste.

5.2 Efeito dos extratos hidroetanólicos da própolis vermelha e *Dalbergia ecastophyllum* sobre formas promastigotas de *Leishmania chagasi* e *Leishmania amazonensis*

Muitos produtos naturais estão sendo estudados por possuírem atividades biológicas que podem ser usadas para o tratamento de diversas doenças. Neste sentido, há uma busca por substâncias que conduzam ao desenvolvimento de uma nova classe de fármacos para a quimioterapia de doenças, incluindo as de origem parasitária (Cunha et al, 2011).

Existem vários estudos relatando a atividade antiprotozoária da própolis, incluindo sua ação contra *Giardia lamblia*, *Trichomonas vaginalis*, *Toxoplasma gondii*, *Leishmania donovani* e *Trypanosoma cruzi* (Salomão et al., 2011; Wagh, 2013).

No presente estudo foram avaliados *in vitro* os efeitos de diferentes concentrações dos extratos hidroetanólicos obtidos da própolis vermelha e da entrecasca de *D. ecastophyllum* sobre o crescimento de formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi* durante 24h. Conforme pode ser observado nas Figuras 12 e 13, a redução na viabilidade dos promastigotas foi inversamente proporcional às concentrações dos extratos, demonstrando uma atividade dose-dependente dos mesmos.

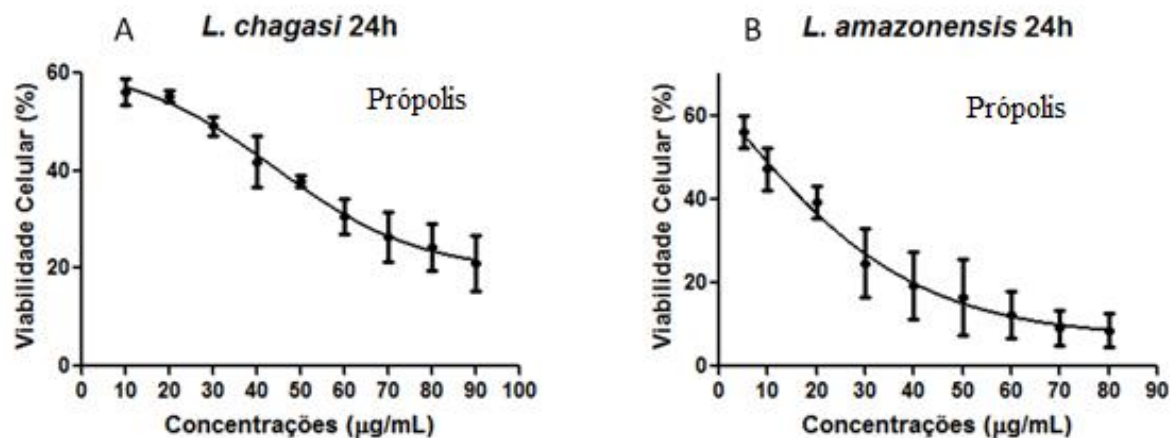


Figura 12: Efeito dose-dependente do extrato hidroetanólico da própolis vermelha sobre formas promastigotas de *L. chagasi* (A) e *L. amazonensis* (B) cultivadas durante 24h. Os pontos representam a média de três experimentos e a barra o desvio padrão.

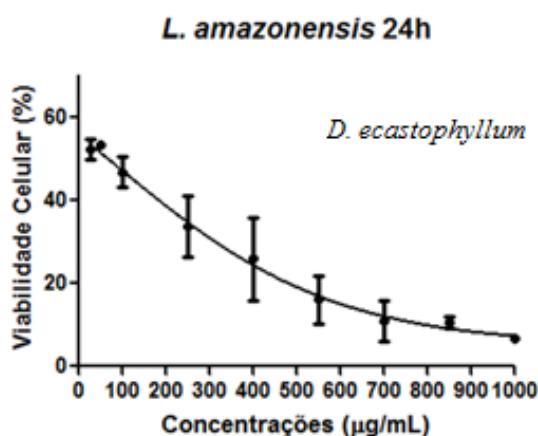


Figura 13: Efeito dose-dependente do extrato hidroetanólico de *Dalbergia ecastophyllum* sobre formas promastigotas de *L. amazonensis* cultivadas durante 24h. Os pontos representam a média de dois experimentos e a barra o desvio padrão.

A Figura 12 mostra a redução da viabilidade dos promastigotas (*L. amazonensis* e *L. chagasi*) tratados com o extrato da própolis vermelha em concentrações entre 5 e 90µg/mL, a observação das curvas mostra uma maior sensibilidade de *L. amazonensis* comparada a *L. chagasi* frente aos extratos da própolis. As análises de viabilidade celular dos promastigotas de *L. chagasi* tratados com extratos de *D. ecastophyllum* não apresentaram redução na viabilidade dos parasitos. Deste modo, a Figura 13 mostra apenas o efeito dose-dependente do extrato de *D. ecastophyllum* sobre *L. amazonensis*. Comparando o efeito dos dois extratos sobre a viabilidade dos promastigotas de *L. amazonensis*, observa-se que o efeito do extrato de própolis é cerca de 10 vezes maior em relação ao do extrato de *D. ecastophyllum*. Silva-Filho et al., 2009, realizaram estudos anti-parasitários com própolis verde e sua origem botânica (*Baccharis dracunculifolia*) e encontraram resultados semelhantes para a viabilidade de promastigotas de *L. donovani*, demonstrando maior similaridade na propriedade leishmanicida dos extratos. Os resultados divergentes deste estudo na viabilidade dos promastigotas tratados com EHPV e EHDe sugerem que o fator leishmanicida esteja presente com maior eficácia na própolis vermelha.

Os valores de Concentração Inibitória (IC₅₀) do EHPV obtidos para *L. amazonensis* foi de 9,73 µg/mL e para *L. chagasi* 21,54 µg/mL (Tabela 5). Estes valores refletem o maior efeito sobre a proliferação de promastigotas de *L. amazonenses* comparado com *L. chagasi*. Em adição, promastigotas de ambas as espécies de leishmania avaliadas parecem ser menos sensíveis aos efeitos do EHDe, uma vez que a IC₅₀ obtida para *L. amazonensis* foi de 53,42 µg/mL enquanto que para *L. chagasi* este valor está acima da maior concentração avaliada (1 mg/mL).

Tabela 5: Valores de IC₅₀ para formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi* tratadas com EHPV e EHDe.

Produtos naturais	Espécies	IC ₅₀ * (µg/mL)
Própolis vermelha	<i>L. amazonensis</i>	9,73 ± 1,49
	<i>L. chagasi</i>	21,54 ± 2,58
<i>Dalbergia ecastophyllum</i>	<i>L. amazonensis</i>	53,42 ± 13,38
	<i>L. chagasi</i>	ND*

*IC₅₀ - Concentração capaz de inibir em 50% o crescimento dos promastigotas

*ND – Não determinado

resultados expressos em média ± desvio padrão

Embora este seja o primeiro estudo da atividade leishmanicida do extrato de *D. ecastophyllum*, vários trabalhos vêm sendo realizados com o extrato de própolis e os resultados gerados demonstram que a própolis tem potencial atividade leishmanicida contra diferentes espécies de leishmania. Monzote et al. (2012) avaliaram o efeito de vinte quimiotipos de própolis cubana sobre *Leishmania infantum*. Dentre estes quimiotipos, nove eram de própolis vermelha, as quais apresentaram valores de IC₅₀ variando entre 3,3 e 16,1 µg/mL.

Pontin et al., 2008 demonstraram o efeito da própolis verde sobre isolados de *L. braziliensis*. O extrato mostrou-se ativo para a forma promastigota, proporcionando a morte de 79,3% dos parasitos na concentração de 500 µg/mL e uma IC₅₀ de 18,13 µg/mL. Entretanto, mostrou-se ineficaz sobre formas amastigotas.

Própolis verde coletadas no estado de São Paulo na concentração de 100 µg/ml apresentou o mesmo potencial antiproliferativo de promastigotas de *L. braziliensis* que a droga de referência Glucantime a 250 µg/ml (Silva et al., 2013).

Duran et al. (2008), demonstraram que em concentrações iguais ou superiores que 250 µg/ml, o extrato de Própolis turca do tipo Adana induzia uma redução significativa do crescimento de promastigotas da espécie *L. tropica*. Em estudo posterior, Duran et al. (2011) também demonstraram para própolis turca dos tipos Bursa e Hatay efeitos sobre a viabilidade de promastigotas de *L. infantum* e *L. tropica*. As IC₅₀ obtidas para *L. infantum* foram 125 e 325 µg/mL para a própolis Bursa e Hatay, respectivamente. Em promastigotas de *L. tropica* os valores de IC₅₀ foram semelhantes, 175 µg/mL para a própolis Bursa e 350 µg/mL para a própolis Hatay.

Machado; Leon e Castro (2007), em estudos com a própolis de Minas Gerais relataram efeito significativo contra promastigotas, e obtiveram IC₅₀ de 229.3, 48.6, 49.9 e 48.2 µg/mL em *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. chagasi* e *L. major* respectivamente.

Alguns estudos demonstraram a correlação entre composição química e atividade biológica de amostras de própolis de diferentes regiões do Brasil. Salomão et al. (2008) verificaram que níveis mais elevados de ácido cinâmico 4-hidroxi e derivados presentes em extratos de própolis estavam associados com a atividade contra *Staphylococcus aureus* e *Trypanosoma cruzi*. No estudo de Monzote et al. (2012), foi comprovada a associação entre composição química da própolis e sua atividade antimicrobiana e antiprotozoária, demonstrando a relevância da variação regional em amostras de própolis.

Como já relatado, amostras de própolis vermelha contêm vários compostos bioativos diferentes. Estudos foram realizados utilizando alguns compostos fenólicos isolados presentes neste tipo de própolis e alguns apresentaram atividade antiparasitária relevante. Khaomek et al. (2008), avaliaram a atividade de liquiritigenina sobre *P. falciparum* e encontraram uma IC₅₀ de 12.5 µg/mL. Sartorelli et al. (2009) verificaram a atividade leishmanicida e anti-*T. cruzi* da biochanin, cujas IC₅₀ foram 18.96 e 18.32 µg/mL respectivamente. Isso demonstra que a associação da composição química de própolis com as suas atividades biológicas podem levar à identificação de princípios bioativos, que constituem elementos fundamentais para o desenvolvimento de novos fármacos.

Os resultados de concentração inibitória de EHPV e EHDe sobre promastigotas sugerem que a atividade leishmanicida pode estar envolvida com sinergismo de alguns compostos ou até mesmo em um ou mais compostos isolados que estão presentes nos extratos. A elevada quantidade de compostos do EHDe pode ter suprimido a ação leishmanicida de flavonóides. Uma vez que os resultados obtidos relativos à atividade do EHDe sobre promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi* terem sido menos relevantes quando comparados ao EHPV, as posteriores análises foram realizadas somente com o EHPV.

5.3 Ensaio citotóxico do EHPV sobre macrófagos humanos (MTT)

Os testes de citotoxicidade são primordiais nas fases iniciais de desenvolvimento de drogas antiparasitárias, uma vez que definem a concentração a ser utilizada, em etapas posteriores de avaliação. Além disso, evita danos celulares e asseguram a seletividade para o parasito *in vitro*. O ensaio com MTT é um dos indicadores colorimétrico de viabilidade celular bastante utilizado, sendo capaz de mensurar a função celular mitocondrial conforme a

redução enzimática do sal tetrazólico pelas desidrogenases mitocondriais nas células viáveis (Mosmann, 1983).

Uma vez que os valores de IC_{50} obtidas com o EHPV indicam que este apresenta uma maior atividade leishmanicida que o EHDe neste estudo realizou-se a avaliação de toxicidade somente do EHPV. Esta avaliação foi realizada com base na avaliação da viabilidade dos macrófagos J774 por meio do ensaio colorimétrico baseado na redução de MTT a formazana. A adição de diferentes concentrações do EHPV a culturas de macrófagos seguida da incubação por 24h mostrou redução na viabilidade de acordo com o aumento das concentrações do EHPV (Figura 13)

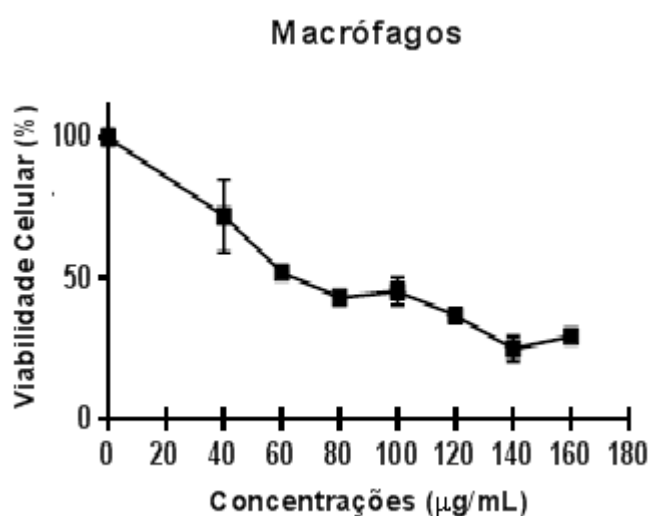


Figura 14: Efeito dose-dependente do extrato hidroeetanólico da própolis vermelha sobre macrófagos J774 incubados durante 24h. Os pontos representam a média de três experimentos e a barra o desvio padrão

A Tabela 6 mostra para o Extrato Hidroeetanólico da Própolis Vermelha uma Concentração Citotóxica para 50% dos macrófagos (CC_{50}) de 72,63 µg/mL.

Tabela 6: Valores de CC_{50} para macrófagos J774 e IC_{50} para formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania chagasi* e seus respectivos índices de seletividade (IS).

	IC_{50} * Promastigotas (µg/mL)		CC_{50} * Macrófagos (µg/mL)
	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. chagasi</i>	
Própolis vermelha	9,73	21,54	72,63±5,89
IS*	7,46	3,37	

* IC_{50} - Concentração capaz de inibir em 50% o número de promastigotas.

* CC_{50} - Concentração Citotóxica para 50% dos macrófagos.

*IS - Índice de seletividade - CC_{50} J774/ IC_{50} promastigotas.

A citotoxicidade do EHPV para macrófagos J774 e para promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi* foi comparada utilizando o índice de seletividade (IS) que consiste na razão entre a Dose Letal 50% (CC₅₀) para macrófagos e IC₅₀ para promastigotas. Os resultados de IS apresentados na Tabela 6 mostram que o EHPV é 7,46 e 3,37 vezes menos tóxicos para os macrófagos do que para as promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi*, respectivamente. Este resultado indica que a ação tóxica apresentada pelo EHPV possui maior seletividade para os promastigotas de *L. amazonenses* uma vez que a concentração necessária para reduzir em 50% o crescimento dos promastigotas de *L. chagasi* é apenas 3,3 vezes menor que a CC₅₀ obtida para os macrófagos.

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que o extrato da própolis vermelha da região do Baixo São Francisco representa uma fonte promissora de compostos com ação leishmanicida, principalmente com ação contra agentes da forma cutânea da doença. Porém, fazem-se necessários estudos adicionais incluindo a avaliação leishmanicida em formas amastigotas, assim como da ação citotóxica em outras linhagens celulares do extrato e de seus componentes isolados.

6 CONCLUSÕES

A caracterização fenólica dos extratos comprovou que a própolis em estudo é do tipo Vermelha a qual tem *Dalbergia ecastophyllum* como sua origem botânica.

Os marcadores fenólicos identificados na caracterização química das amostras podem ser substâncias responsáveis pela atividade leishmanicida, havendo necessidade de estudos posteriores de quantificação destes compostos assim como de sua ação leishmanicida isoladamente.

Os testes *in vitro* realizados para a avaliação de atividade da Própolis Vermelha contra formas promastigotas de leishmania, apresentaram resultados eficientes de inibição de crescimento, sendo este efeito mais expressivo em *L. amazonensis*.

Com base nas IC₅₀ obtidas, EHPV apresentou mior seletividade para os promastigotas de *L. amazonensis*, de modo que as doses necessárias para afetar a viabilidade destas células não têm efeito tóxico relevante aos macrófagos.

A Própolis Vermelha apresentou-se como sugestivo potencial leishmanicida, e possível fonte para posteriores estudos objetivando o desenvolvimento de produtos apiterápicos para o tratamento das leishmanioses, principalmente das formas cutâneas.

Referências Bibliográficas

- Ahn, M.; Kumazawa, S.; Usui, Y.; Nakamura, J.; Matsuka, M.; Zhu, F.; Nakayama, T. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. **Food Chemistry**, 101(4), 1383–1392. 2007.
- Alencar, S. M. de; Aguiar, C. L. de; Paredes-Guzmán, J.; Park, Y. K. Composição química de *Baccharis dracunculifolia*, fonte botânica das própolis dos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Ciência Rural**, 35, 909–915. 2005.
- Alencar, S. M.; Oldoni, T. L. C.; Castro, M. L.; Cabral, I. S. R.; Costa-Neto, C. M.; Cury, J. A.; Rosalen, P. L.; Ikegaki, M.; J. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. **Ethnopharmacology**, 113, 278. 2007.
- Archela, E.; Dall’Antonia, L. H. Determinação de Compostos Fenólicos em Vinho: Uma revisão. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, 34 (2), 193-210. 2013.
- Awale, S.; Li, F.; Onozuka, H.; Esumi, H.; Tezuka, Y.; Kadota, S. Constituents of Brazilian red propolis and their preferential cytotoxic activity against human pancreatic PANC-1 cancer cell line in nutrient-deprived condition. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 16(1), 181–9. 2008.
- Ayres, D. C.; Marcucci, M. C.; Giorgio, S. Effects of Brazilian propolis on *Leishmania amazonensis*. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, 102(2), 215-220, 2007.
- Bankova, V. Recent trends and important developments in propolis research. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine : eCAM**, 2(1), 29–32. 2005.
- Banskota, A. H.; Tezuka, Y.; Midorikawa, K.; Matsushige, K.; Kadota, S. Two Novel Cytotoxic Benzofuran Derivatives from Brazilian Propolis. **Journal of Natural Products**, 63(9), 1277–1279. 2000.
- Barral, A; Costa, J. Leishmanias e Leishmaniose Tegumentar nas Américas. **Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ): Bahia**, 248. 2011.
- Barrett, M.; Gilbert, I. Perspectives for New Drugs Against Trypanosomiasis and Leishmaniasis. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, 2(5), 471–482. 2002.
- Bittencourt, F. O. Desenvolvimento e avaliação da atividade antimicrobiana contra *Candida albicans* de formulações semi-sólidas contendo própolis vermelha. Dissertação de mestrado, **Universidade Tiradentes - UNIT**, Aracaju, SE, Brasil, 2008.
- Burdock, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. **Food and Chemical Toxicology**, 36(4), 347–363. 1998.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção *Leishmania*-HIV. **Secretaria de Vigilância em Saúde: Normas e Manuais Técnicos**: Brasília, 1a ed., 8–11. 2011.

BRASIL, Ministério da Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. **Secretaria de Vigilância em Saúde**: Brasília 15–20. 2006.

Buriol, L.; Finger, D.; Schmidt, E. M.; Santos, J. M. T.; Roberto, M.; Pércio, S.; Nogueira, M. Composição química e atividade biológica de extrato oleoso de própolis: uma alternativa ao extrato etanólico. **Química Nova**, 32(2), 296–302. 2009.

Cabral, I. S. R; Oldoni, T. L. C; Prado, A; Bezerra, R. M. N; Alencar, S. M; Ikegaki, M. Rosalen, P. L. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, 32, 1523-1527. 2009.

Costa, J. M. L. Epidemiologia das Leishmanioses no Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**, 1(Ic), 3–17. 2005.

Croft, S. L.; Seifert, K.; Yardley, V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. **Indian Journal Medicine Reserch**, 399–410. 2006.

Cunha, L. C.; Darlene, L.; Alves, S.; Citó, L.; Resende, L. A Própolis no Combate a Tripanossomatídeos de Importância Médica : Uma Perspectiva Terapêutica para Doença de Chagas e Leishmaniose. **Revista de Patologia Tropical**, 40(2), 105–124. 2011.

Daugusch, A.; Moraes, C. S.; Fort, P.; Park, Y. K. Brazilian red propolis-chemical composition and botanical origin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine : eCAM**, 5(4), 435–41. 2008.

DNDi - Iniciativa Drogas para Doenças Negligenciadas. A Decade of R & D for Neglect Patients. **Annual Report**, 50-58. 2013.

Duran, G.; Duran, N.; Culha, G.; Ozcan, B.; Oztas, H.; Ozer, B. In vitro antileishmanial activity of Adana propolis samples on *Leishmania tropica*: a preliminary study. **Parasitology Research**, 102(6), 1217–25. 2008.

Ferreira, F. M.; Castro, R. A. O.; Batista, M. A.; Rossi, F. M. O.; Silveira-Lemos, D.; Frézard F.; Moura, S. A. L.; Rezende, S. A. Association of water extract of green propolis and liposomal meglumine antimoniate in the treatment of experimental visceral leishmaniasis. **Parasitol Res**, 113, 533–543, 2014.

Fontana, J. D.; Adelman, J.; Passos, M.; Maraschin, M.; Lacerda, C. A. de; Lanças, F. M. Propolis: chemical micro-heterogeneity and bioactivity. In: New Jersey: **Humana press**, 203-218. 2004.

Franchi, G. C.; Moraes, C. S.; Toreti, V. C.; Daugsch, A.; Nowill, A. E.; Park, Y. K. Comparison of effects of the ethanolic extracts of brazilian propolis on human leukemic cells as assessed with the MTT assay. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine : eCAM**, 91, 89-56. 2012.

Frozza, C. O. D. S.; Garcia, C. S. C.; Gambato, G.; de Souza, M. D. O.; Salvador, M.; Moura, S.; Roesch-Ely, M. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. **Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association**, 52, 137–42. 2013.

- Funari, C. S.; Ferro, V. O. Análise de própolis. **Ciência Tecnologia Alimentar**, 26(1), 171–178. 2006.
- Grimaldi, G.; Tesh, R. B. Leishmaniasis of the New World: Current Concepts and Implications for Future Research. **Clinical Microbiology Reviews.**, 6(3), 230-250, 1993.
- Hamann, E. M. Ensaio Terapêutico com Quatro Dosagens de Antimonial no Tratamento de Leishmaniose Cutânea Causada por *Leishmania (Viannia) brasiliensis*. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) – **Faculdade de Ciências da Saude**, Universidade de Brasília, 149, 1989.
- Harvey, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, 13(19-20), 894–901. 2008.
- Hernandez, I.M.; Fernandez, M.C.; Cuesta-Rubio, O.; Piccinelli, A.L.; Rastrelli, L. Polyprenylated benzophenone derivatives from Cuban propolis. **Journal of Natural Products**, 68, 931–934, 2005.
- Kahkonen, M. P.; Hopia, A. I.; Vuorela, H. J.; Rauha, J. P.; Pihlaja, K.; Kujala, T. S. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 47, 3954-3962. 1999.
- Kamiya, T.; Nishihara, H.; Hara, H.; Adachi, T. Ethanol Extract of Brazilian Red Propolis Induces Apoptosis in. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 60, 11065–11070. 2012.
- Kayser, O.; Kiderlen, A. F.; Croft, S. L. Natural products as antiparasitic drugs. **Parasitology Research**, 90 (2), 55–62. 2003.
- López, B. G. C.; Schmidt, E. M.; Eberlin, M. N.; Sawaya, A. C. H. F. Phytochemical markers of different types of red propolis. **Food Chemistry**. 146, 174–80. 2014.
- Lustosa S. R.; Galindo, A. B.; Nunes, L. C. C.; Randau, K. P.; Rolim-Neto, P. J. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 18(3), 447-454. 2008.
- Machado, G. M. de C.; Leon, L. L.; Castro, S. L. de. Activity of Brazilian and Bulgarian propolis against different species of *Leishmania*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 102, 73–77. 2007.
- Maia-Araújo, Y. L. F.; Mendonça, L. S.; Orellana, S. C.; Araújo E. D. Comparação entre duas técnicas utilizadas no teste de sensibilidade antibacteriana do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha. **Scientia Plena**, 7 (4), 046201, 2011.
- Marcucci, M. C.; Ferreres, F., Garcia.; C. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**, 74, 105–112. 2001.
- Markle, W. H.; Makhoul, K. Cutaneous Leishmaniasis: Recognition and Treatment. **American Family Physician**, 69, 1455–1461. 2004.

- Meyerhoff A. U. S. Food and Drug Administration approval of AmBisome (liposomal amphotericin B) for treatment of visceral leishmaniasis. **Clinical Infect Diseases**, 28, 42-8. 1999.
- Montalvo, C. A. M.; Fraga, J.; Monzote, C. L. Diagnóstico de la leishmaniasis : de la observación microscópica del parásito a la detección del ADN Leishmaniasis diagnosis : going from microscopic observation of parasite to DNA detection. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, 64(2), 108–131. 2012.
- Monzote, L.; Cuesta-rubio, O.; Fernandez, M. C.; Hernandez, I. M.; Fraga, J.; Pérez, K.; Cos, P. In vitro antimicrobial assessment of Cuban propolis extracts. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, 107, 978–984. 2012.
- Mosman, T. Rapid Colorimetric assay for cellular growth and Survival: application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal Immunological Methods**, 65, 55-63. 1983.
- Newman, D. J. Natural Products as Leads to Potential Drugs : An Old Process or the New Hope for Drug Discovery? **Journal Mediccine Chemistry**, 51, 2589–2599. 2008.
- Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, 70(3), 461–477. 2007.
- Newton, S. M.; Lau, C.; Gurcha, S. S.; Besra, G. S.; Wright, C. W. The evaluation of forty-three plant species for in vitro antimycobacterial activities; isolation of active constituents from *Psoralea corylifolia* and *Sanguinaria canadensis*. **Journal Ethnopharmacol**, 79, 57–67. 2002
- Nicolaou, K. C.; Chen, J. S.; Dalby, S. M. From nature to the laboratory and into the clinic. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 17(6), 2290–303. 2009.
- Nogueira, M. A.; Diaz, M. G.; Tagami, P. M.; Lorscheide, J. Atividade microbiana de óleos essenciais e extratos de própolis sobre bactérias cariogênicas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, 28, 93–97. 2007.
- Organização Mundial da Saúde (OMS). Control of the leishmaniasis. **WHO Technical Report Series**, (Geneva), 22–26. 2010.
- Organização Mundial da Saúde (OMS). Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases. **WHO Library**, 67. 2013.
- Organização Mundial da Saúde (OMS). *World : Endemicity of cutaneous leishmaniasis*. Disponível em: http://gamapserv.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis_CL_2013.png < Acesso em: 13 Out. 2014.
- Park, Y.; Carlos, G.; Júnior, F. Própolis vermelha leucêmicas humanas. **Jornal da UNICAMP**, 2(019), 13081. 2011.
- Park, Y. K.; Alencar, S. M.; Scamparini, A. R. P.; Aguiar, C. L. Própolis Produzida no Sul do Brasil, Argentina e Uruguai: Evidências Fitoquímicas de sua Origem Vegetal. **Ciência Rural**. 32 (6), 997-1003. 2002.

- Park, Y. K.; Alencar, S. M.; Aguiar, C. L. Botanical Origin and Chemical Composition of Brazilian Propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50(9), 2502–2506. 2002.
- Peters, N. C; Egen, J. G; Secundino, N.; Debrabant, A; Kimblin, N; Kamhawi, S; Lawyer, P.; Fay, M. P, Germain, R. N; Sacks, D. In vivo Imaging Reveals an Essential Role for Neutrophils in Leishmaniasis Transmitted by Sand Flies Science. **Science**. 322(5908), 1 634. 2008.
- Piccinelli, A. L.; Lotti, C.; Campone, L.; Cuesta-rubio, O.; Fernandez, M. C.; Rastrelli, L., Habana, L. Cuban and Brazilian Red Propolis : Botanical Origin and Comparative Analysis by High-Performance Liquid Chromatography a Photodiode Array Detection / Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 59, 6484–6491. 2011.
- Pimenta, P. F. P.; Turco, S. J. Stage-specific adhesion of Leishmania promastigotes to the sandfly midgut. **Science**, 256(5065): 1812-1815. 1992.
- Pontin, K.; Silva Filho, A. da A; Santos, F. F.; Silva, M. L. A. E.; Cunha, W. R.; Nanayakkara, N. P. D.; Albuquerque, S. de. *In vitro* and in vivo antileishmanial activities of a Brazilian green propolis extract. **Parasitology Research**, 103(3), 487–92. 2008.
- Rath, S.; Trivelin, L. A.; Imbrunito, T. R.; Tomazela, D. M.; Jesús, M. N. de; Marzal, P. C. Antimoniais Empregados no Tratamento da Leishmaniose: Estado da Arte. **Química Nova**, 26(4), 550–555. 2003.
- Sacks, D.; Kamhawi, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. **Annual Rev Microbiology**, 55, 453-483. 2001.
- Sacks D.; Sher A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. **Nature Immunol**, 3, 1041-1047. 2002.
- Salatino, A.; Fernandes-Silva, C. C.; Righi, A. A.; Salatino, M. L. F. Propolis research and the chemistry of plant products. **Natural Product Reports**, 28(5), 925–36. 2011.
- Salomão, K.; Pereira, P. R. S.; Campos, L. C.; Borba, C. M.; Cabello, P. H.; Marcucci, M. C.; de Castro, S. L. Brazilian propolis: correlation between chemical composition and antimicrobial activity. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine : eCAM**, 5(3), 317–24. 2008.
- Sartorelli, P.; Carvalho, C. S.; Reimão, J. Q.; Ferreira, M. J.; Tempone, A. G. Antiparasitic activity of biochanin A, an isolated isoflavone from fruits of *Cassia fistula* (Leguminosae). **Parasitol Research**, 104, 311-314. 2009.
- Silva, B. B.; Rosalen, P. L., Cury, J. A; Ikegaki, M.; Souza, V. C.; Esteves, A.; Alencar, S. M. Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of brazilian propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine : eCAM**, 5(3), 313–316. 2008.
- Silva, S. S. da; Thomé, G. D. S.; Cataneo, A. H. D.; Miranda, M. M.; Felipe, I.; Andrade, C. G. J.; Conchon-Costa, I T. D. Brazilian propolis antileishmanial and immunomodulatory effects. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM**, 67, 30-58. 2013.

Silva, D. G. da. Padronização do cultivo de amastigotas axênicos e intracelulares de *Leishmania* spp . e análise da atividade leishmanicida de chalconas. **Dissertação:** Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 120. 2008.

Silva Filho, A. A. da; Resende, D.O.; Fukui, M. J.; Santos, F. F.; Pauletti, P. M.; Cunha, W. R.; Silva, M. L. A.; Gregório, L. E.; Bastos, J. K.; Nanayakkara, N. P. D. *In vitro* antileishmanial, antiplasmodial and cytotoxic activities of phenolics and triterpenoids from *Baccharis dracunculifolia* D. C. (Asteraceae). **Fitoterapia**, 80, 478–482. 2009.

Song, Y. S.; Jin, C.; Jung, K. J.; Park, E.-H. Estrogenic effects of ethanol and ether extracts of propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, 82(2-3), 89–95. 2002.

Tiuman, T. S.; Santos, A. O.; Ueda-Nakamura, T.; Filho, B. P. D.; Nakamura, C. V. Recent advances in leishmaniasis treatment. International Journal of Infectious Diseases. **Official Publication of the International Society for Infectious Diseases**, 15(8), 525–32. 2011.

Tomás-Barberán, F.A., Garcia-Viguera, C., Vit-Olivier, P., Ferreres, F., Tomás- Lorente, F. Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela. **Phytochemistry**, 34, 191–196. 1993.

Trusheva, B.; Popova, M.; Bankova, V.; Simova, S.; Marcucci, M. C.; Miorin, P. L.; Tsvetkova, I. Bioactive constituents of brazilian red propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine : eCAM**, 3(2), 249–54. 2006.

Turolla, M. S. dos R.; Nascimento, E. de S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 42, 289–306. 2006.

Wagh, V. D. Propolis: a wonder bees product and its pharmacological potentials. **Advances in Pharmacological Sciences**. 2013, 308249. 2013.

Wilson, R.; Bates, M. D.; Dostalova, A.; Jecna, L.; Dillon, R. J.; Volf, P.; Bates, P. A. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to sand fly midguts assessed using an improved comparative binding assay. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 4(9), 1–9. 2010.