

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS**  
**ESCOLA DE ENFERMAGEM E FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**ELLEN LYRA ALVES**

**Investigação de terapia combinada própolis vermelha de Alagoas - antimonial para  
tratamento de Leishmaniose Tegumentar**

**Maceió**  
**2019**

ELLEN LYRA ALVES

**Investigação de terapia combinada própolis vermelha de Alagoas -antimonial para  
tratamento de Leishmaniose Tegumentar**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Camila Braga Dornelas

**Maceió**

**2019**

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**

Bibliotecária: Taciana Sousa dos Santos – CRB-4 – 2062

A474i Alves, Ellen Lyra.  
Investigação de terapia combinada própolis vermelha de Alagoas –  
antimonial para tratamento de Leishmaniose Tegumentar / Ellen Lyra Alves.  
– 2021.  
79 f. : il. color.

Orientadora: Camila Braga Dornelas.  
Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal de  
Alagoas. Instituto de Ciências Farmacêuticas. Maceió, 2021.

Bibliografia: f. 69-77.  
Anexos: f. 78-79.

1. Leishmaniose Tegumentar. 2. Tratamento. 3. Glucantime. 4. Fármacos.  
5. Própolis vermelha de Alagoas. I. Título.

CDU: 616.928.5: 615.4

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por sempre renovar a minha fé através da realização dos meus sonhos, sem Ele não teria chegado até aqui.

Aos meus pais, Rosário Lyra e Everaldo Alves, por ser minha base, por todo apoio em minhas escolhas, pelo amor, compreensão e por acreditarem que a educação é a maior herança que se pode deixar para um filho. Tudo o que faço sempre é pensando em vocês.

Aos meus tios e padrinhos, Georgina Lira e José Antônio, por serem meus pais postiços, por todo apoio, incentivo e amor. Serei sempre grata por tudo.

A minha orientadora Camila Dornelas, por ter me recebido de braços abertos, por me dar a oportunidade de realizar meu sonho, e pelos momentos de descontração que foram poucos, mas valiosos, para tornar a caminhada mais prazerosa.

A professora Aline Fidelis, por toda força e carinho demonstrados a mim, você é uma querida!

A professora Célia Pedrosa, por me tornar uma pessoa e profissional melhor, por me ensinar a enxergar a importância que um paciente tem, e por ser com certeza minha mãe científica.

Aos colegas do TecNano, pelos momentos compartilhados, pelas ajudas nos experimentos e por serem muitas vezes minha segunda família.

A Valcilaine Teixeira, por ser minha dupla, tenho certeza de que o esquadrão da própolis não seria o mesmo sem você.

A Janaína Menezes, por todas as palavras de apoio e incentivo, convivemos pouco mas você foi especial.

Aos colegas do LBFI, pelos momentos de descontração, pelos nossos almoços, e por fazerem parte da minha família científica.

A Gerson Ponce e Valdemir Costa, sem a ajuda de vocês e o UV não teria conseguido.

As amigas que a FARMACIA me deu Débora Ramos, Paula Dantas, Evelyn Lima e claro o Theozinho, levarei vocês para vida. Muito obrigada pelas palavras de incentivo e por sempre pararem para me escutar, o apoio de vocês foi fundamental.

As amigas distantes Lays Trajano e Luana Trajano, por todas as mensagens de apoio e amor, e por sempre se mostrarem presentes mesmo ausentes fisicamente.

A todos das turmas 2016.1 e 2016.2 do mestrado, por compartilharem junto comigo, os momentos de alegrias e de tristezas, sejam regados por disciplinas, artigos, experimentos ou não.

A Geone Pimentel, que foi um presente que a Pós me deu, obrigada minha amiga por tudo.

Agradeço por fim:

À ESENFAR por permitir o uso das instalações físicas e por me acolher desde a graduação.

A FAPEAL, pelo apoio financeiro para a realização dos experimentos.

A CAPES/CNPq que concedeu a bolsa de pós-graduação.

## RESUMO

A Leishmaniose Tegumentar (LT) é uma doença negligenciada que pode culminar em lesões destrutivas e até desfigurantes. O tratamento da leishmaniose é efetuado com reduzida opção de quimioterápicos e por via sistêmica. Os antimonialis pentavalentes (no Brasil, Glucantime<sup>®</sup>), são o tratamento de primeira escolha, porém seu uso acompanha alta toxicidade, como alterações cardíacas, hepáticas, pancreáticas e/ou renais. Algumas associações de fármacos são descritas como altamente eficientes e foram adotadas e indicadas pela OMS. Assim, considerando-se as atividades leishmanicida e cicatrizante da própolis, o presente trabalho objetivou avaliar *in vitro* e *in vivo* o efeito do extrato da própolis vermelha de Alagoas (PVA) por via tópica e oral em co-terapia com Glucantime<sup>®</sup> sobre as lesões de LT. Para tal, o extrato de PVA foi previamente caracterizado de acordo com o Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), e o extrato bruto foi incorporado em uma pomada-base. Para avaliação da estabilidade da formulação de uso tópico, foram analisados: características organolépticas, pH e viscosidade. As análises *in vivo* contaram com etapa pré-clínica, em camundongos BALB/c infectados, para avaliação da carga parasitária, tamanho das lesões e análise histológica do baço, rins e fígado. Também foi avaliado a atividade antioxidante do extrato de PVA. No que diz respeito aos parâmetros do MAPA, o extrato atendeu ao requisitos mínimos, exceto a atividade de oxidação. O extrato hidroalcoólico apresentou atividade antioxidante. Não foram observadas alterações na estabilidade da pomada durante os 8 meses de avaliação. Com relação a carga parasitária e ao tamanho das lesões, não houve diferença significativa entre o grupo que utilizou apenas o tratamento convencional com o antimonial (controle) e a co-terapia. No entanto, a análise histológica revelou a preservação das características do baço, rins e fígado, demonstrando um efeito protetor sobre estes órgãos quando do uso tópico do extrato bruto da própolis. Diante do exposto, conclui-se que a co-terapia entre pomada com extrato e Glucantime<sup>®</sup> pode contribuir para redução dos efeitos secundários do tratamento convencional. O extrato hidroalcoólico não atendeu a todos os parâmetros do MAPA, mas apresentou atividade antioxidante pelo método de DPPH e seguirá para novos testes.

**Palavras-chave:** Leishmaniose Tegumentar, própolis vermelha de Alagoas, Glucantime

## ABSTRACT

Cutaneous Leishmaniasis (CL) is a neglected disease that can culminate in destructive and even disfiguring lesions. The treatment of leishmaniasis is carried out with reduced choice of chemotherapy and systemically. The pentavalent antimonials (in Brazil, Glucantime®) are the first choice treatment, but their use is accompanied by high toxicity, such as cardiac, hepatic, pancreatic and/or renal changes. Some drug combinations are described as highly efficient and have been adopted and indicated by WHO. Thus, considering the leishmanicidal and cicatrizant activities of propolis, the present work aimed to evaluate *in vitro* and *in vivo* the effect of Alagoas red propolis extract (RPA) by topical and oral route in co-therapy with Glucantime® on the lesions of CL. For this, the RPA extract was previously characterized according to the Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply (MAPA), and the crude extract was incorporated into a base ointment. To evaluate the stability of the topical formulation, we analyzed: organoleptic characteristics, pH and viscosity. *In vivo* analyzes were performed in pre-clinical stages in infected BALB/c mice for evaluation of parasite load, lesion size and histological analysis of spleen, kidneys and liver. The antioxidant activity of the RPA extract was also evaluated. Regarding the MAPA parameters, the extract met the minimum requirements, except the oxidation activity. The hydroalcoholic extract presented antioxidant activity. No changes in ointment stability were observed during the 8-month evaluation. Regarding the parasitic load and the size of the lesions, there was no significant difference between the group that used only conventional treatment with antimonial (control) and co-therapy. However, histological analysis revealed the preservation of spleen, kidney and liver characteristics, demonstrating a protective effect on these organs when topical use of crude propolis extract. In view of the above, it is concluded that co-therapy between ointment with extract and Glucantime® may contribute to reducing the side effects of conventional treatment. The hydroalcoholic extract did not meet all the parameters of MAPA, but presented antioxidant activity by the DPPH method and will continue for new tests

**Key-words:** Cutaneous Leishmaniasis, red propolis of Alagoas, Glucantime

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Quadro 1-</b>	Identificação dos 13 tipos diferentes de propolis no Brasil com base em suas características físico-químicas e localização geográfica.	18
<b>Figura 1-</b>	a) Exsudação da resina vermelha pela <i>Dalbergia ecastophyllum</i> (L) Taub.; b) propolis vermelha produzida pelas abelhas <i>Apis mellifera</i> .	19
<b>Figura 2-</b>	Protozoário <i>Leishmania spp.</i> (A) forma promastígota; (B) forma promastígota.	21
<b>Figura 3-</b>	Vetor da leishmaniose.	22
<b>Figura 4-</b>	Ciclo de vida da <i>Leishmania</i> , mostrando fase do ciclo no hospedeiro invertebrado (flebotomíneo) e vertebrado (mamífero).	23
<b>Quadro 2-</b>	Principais espécies de <i>Leishmania</i> que causam Leishmaniose Tegumentar em humanos.	24
<b>Figura 5-</b>	Lesão cutânea de Leishmaniose Tegumentar.	25
<b>Figura 6-</b>	Mapa mundial com casos relatados de Leishmaniose Tegumentar.	26
<b>Figura 7-</b>	Casos confirmados de Leishmaniose Tegumentar no Brasil – 1980 a 2014.	26
<b>Figura 8-</b>	Casos de Leishmaniose Tegumentar no município de Alagoas, dos anos 2010 a 2016.	27
<b>Figura 9-</b>	Curva padrão de quercetina, com sua respectiva equação da reta.	34
<b>Figura 10-</b>	Reação da formação do complexo entre o Al (III) e os flavonoides.	35
<b>Figura 11-</b>	Curva padrão de ácido gálico, com sua respectiva equação da reta.	36
<b>Figura 12-</b>	Espectro de absorção com bandas características das principais classes de flavonoides em extrato de PVA.	46
<b>Figura 13-</b>	Placas com meio ágar chocolate com ausência de	47



crescimento de colônias de bactérias.

<b>Figura 14-</b>	Cinética da atividade sequestradora do radical livre DPPH (ASR)	49
<b>Figura 15-</b>	Avaliação in vivo na etapa pré-clínica. (A) carga parasitária; (B) tamanho das lesões.	53
<b>Figura 16-</b>	Aspectos morfológicos do baço.	55
<b>Figura 17-</b>	Aspectos morfológicos dos rins.	57
<b>Figura 18-</b>	Aspectos morfológicos do fígado.	59

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b>	Teor de compostos fenólicos e flavonoides presentes no extrato de propolis vermelha de Alagoas.	44
<b>Tabela 2-</b>	Avaliação da atividade leishmanicida e citotoxicidade.	49
<b>Tabela 3-</b>	Atividade antioxidante do extrato de própolis vermelha de Alagoas.	51

## LISTA DE SÍMBOLOS

<b>Equação 1-</b>	Fórmula para determinar o teor de ceras do extrato hidroalcoólico de PVA	33
<b>Equação 2-</b>	Fórmula para encontra a porcentagem de flavonoides e fenólicos totais nas amostras de propolis.	34
<b>Equação 3-</b>	Fórmula para encontrar o valor da viscosidade das formulações semissólidas desenvolvidas.	38
<b>Equação 4-</b>	Fórmula para encontrar o percentual de redução para inibição do radical livre DPPH.	39

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>PVA -</b>	Própolis vermelha de Alagoas
<b>IG -</b>	Indicação Geográfica
<b>INPI-</b>	Instituto Nacional da Propriedade Industrial
<b>LT -</b>	Leishmaniose Tegumentar
<b>LTA -</b>	Leishmaniose Tegumentar Americana
<b>LV -</b>	Leishmaniose Visceral
<b>OMS -</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>DNA -</b>	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucléico)
<b>SbV -</b>	Antimonial pentavalente
<b>SbIII -</b>	Antimonial trivalente
<b>FDA -</b>	<i>Food and Drug Administration</i> (Administração de Comidas e Fármacos)
<b>PA</b>	Instituto Aggeu Magalhães
<b>MAPA -</b>	Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento
<b>Al -</b>	Alumínio
<b>RFC -</b>	Reagente de Folin-Ciocalteu
<b>pH -</b>	Potencial Hidrogeniônico
<b>CC<sub>50</sub> -</b>	Concentração citotóxica para 50% das células
<b>IC<sub>50</sub>PRO -</b>	Concentração que inibe em 50% as formas promastigotas
<b>IC<sub>50</sub>AMA-</b>	Concentração que inibe em 50% as formas amastigotas
<b>MTT -</b>	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
<b>DPPH -</b>	2-difenil-1-picrilideazil
<b>CEUA -</b>	Comitê de Ética no Uso de Animais
<b>CPqAM -</b>	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
<b>CIM -</b>	Concentração Inibitória Mínima

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	16
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	17
<b>2.1 Própolis</b>	17
<b>2.2 Aspectos gerais sobre as leishmanioses</b>	20
<b>2.3 Leishmaniose Tegumentar</b>	23
2.3.1 Dados epidemiológicos da LT	25
2.3.2 Diagnóstico e tratamento da LT	27
<b>3 OBJETIVOS</b>	31
<b>3.1 Objetivo Geral</b>	31
<b>3.2 Objetivos Específicos</b>	31
<b>4 METODOLOGIA</b>	32
<b>4.1 Coleta e armazenamento da própolis vermelha de Alagoas</b>	32
<b>4.2 Obtenção e padronização do extrato bruto da própolis vermelha de Alagoas</b>	32
<b>4.3 Elaboração e caracterização do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha de Alagoas</b>	32
4.3.1 Características sensoriais	32
4.3.2 Características físico-químicas	32
4.3.2.1 <i>Teor de extrato seco</i>	33
4.3.2.2 <i>Teor de ceras</i>	33
4.3.2.3 <i>Compostos flavonoides</i>	33
4.3.2.4 <i>Compostos fenólicos</i>	35
4.3.2.5 <i>Atividade de oxidação</i>	36
4.3.2.6 <i>Teor alcoólico</i>	37
4.3.2.7 <i>Análise de picos característicos através de espectro de absorção de radiações UV-vis</i>	37
4.3.2.8 <i>Solubilidade em acetate de chumbo</i>	37
4.3.2.9 <i>Solubilidade em hidróxido de sódio</i>	37
4.3.3 Pesquisa de esporos <i>Paenibacillus larvae</i>	37
<b>4.4 Avaliação da atividade antioxidante</b>	38

<b>4.5 Preparação, desenvolvimento e caracterização da formulação semisólida</b>	39
4.5.1 Avaliação da estabilidade	39
<b>4.6 Avaliação da atividade leishmanicida e citotoxicidade in vitro</b>	40
<b>4.7 Avaliação pré-clínica</b>	40
4.7.1 Pomada	40
4.7.2 Extrato hidroalcoólico	41
<b>4.8 Análise estatística</b>	41
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	42
<b>5.1 Obtenção e padronização do extrato bruto de própolis vermelha de Alagoas</b>	42
<b>5.2 Caracterização do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha de Alagoas</b>	42
5.2.1 Avaliação de características sensoriais, físico-químicas e pesquisa de contaminantes	43
<b>5.3 Avaliação da atividade antioxidante</b>	47
<b>5.4 Avaliação da estabilidade e caracterização da formulação semissólida</b>	49
<b>5.5 Avaliação da atividade leishmanicida e citotoxicidade in vitro</b>	50
<b>5.6 Avaliação pré-clínica</b>	52
5.6.1 Pomada	52
5.6.2 Extrato hidroalcoólico	54
<b>6 CONCLUSÃO</b>	62
<b>REFERÊNCIAS</b>	63
<b>ANEXOS</b>	71
<b>ANEXO A – Aprovação CEUA/CPqAM – Fev/2016</b>	72
<b>ANEXO B - Aprovação CEUA/CPqAM – Fev/2018</b>	60

## 1. INTRODUÇÃO

Produzida pelas abelhas (*Apis mellifera*), a própolis é uma mistura complexa, sendo considerada um produto biotecnológico, formada por material resinoso e balsâmico, coletada pelas abelhas e que tem sido bastante utilizada em medicina tradicional e alternativa para tratamento de diversas doenças (DO NASCIMENTO et al., 2016; PEREIRA et al., 2002).

Já foram identificadas várias substâncias em diferentes amostras de própolis, incluindo flavonoides, ácidos aromáticos, ácidos graxos, fenóis, aminoácidos, vitaminas e minerais (PEREIRA et al., 2002) que justificam a gama de propriedades biológicas, dentre elas, atividade cicatrizante no tratamento de feridas (TORETI et al., 2013) e atividade leishmanicida (AYRES et al., 2011; NINA et al., 2016).

As leishmanioses são um grupo de doenças causadas por parasitas protozoários de mais de 20 espécies de *Leishmania* (OMS, 2017). A leishmaniose tegumentar (LT) é uma doença infecciosa, não contagiosa que provoca lesões na pele e mucosas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017) e é considerada a forma mais comum da doença em todo o mundo, representando 50-75% de todos os casos novos (REBOUÇAS-SILVA et al., 2017).

Os antimoniais pentavalentes (SbV) são os fármacos de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses (OMS, 2010). Apesar de ser utilizado há muitos anos, possuem efeitos adversos, que variam desde vômitos e artralgia, até insuficiência renal aguda, cardiotoxicidade, entre outros (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Outras modalidades utilizadas para tratamento de leishmaniose são esquemas de terapia combinada (MEYMANDI et al., 2011). Neste contexto, as substâncias de fontes naturais também fazem parte da busca por novas alternativas de terapia, com o intuito de oferecer opções de tratamento de baixo custo e com menor toxicidade (SANTOS et al., 2014).

Tendo em vista os efeitos colaterais causados pelo tratamento convencional e as atividades biológicas da própolis, o objetivo deste trabalho foi investigar o efeito, *in vitro* e *in vivo*, da associação do extrato de própolis vermelha de Alagoas (PVA) com antimoniato de meglumina, no tratamento da Leishmaniose Tegumentar.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Própolis

A própolis é conhecida por suas propriedades curativas e tem sido bastante utilizada na medicina popular, devido à presença de componentes químicos que justificam sua atividade farmacológica (DO NASCIMENTO et al., 2016; KUROPATNICKI, SZLISZKA & KROL, 2013; SFORCIN & BANKOVA, 2011; SUN GUANG-WEI et al., 2016; TORETI et al., 2013). O termo própolis possui sua origem do grego: *pro* – em defesa de, e *polis* – cidade (BANSKOTA et al., 2001; LUSTOSA et al., 2008).

Própolis é uma denominação genérica utilizada para caracterizar uma mistura complexa de substâncias resinosas, gomosas e balsâmicas colhidas por abelhas melíferas de brotos, flores e exsudatos de plantas, às quais as abelhas adicionam secreções salivares, cera e pólen para a elaboração do produto final (BRASIL, 2001; ODA et al., 2011; RISTIVOJEVIĆ et al., 2015). As secreções salivares e as enzimas são adicionadas a este produto como forma de proteção contra insetos, microrganismos invasores e reparação de colméias (DE MENDONÇA et al., 2015; MARCUCCI, 1996; PEREIRA et al., 2002).

Existe um grande número de espécies de abelhas indígenas brasileiras nativas que misturam resinas de plantas com cera (cerúmen) e às vezes argila (geopropolis) e usam isso como forma de defesa contra os mais variados tipos de predadores e doenças (DUTRA et al., 2008). Este papel natural de proteção fornece à própolis um amplo espectro de atividades biológicas, que validam seu uso para o tratamento de várias condições, incluindo inflamações, feridas ou queimaduras, dor de garganta, doenças virais e úlceras (PICCINELLI et al., 2011).

Pesquisas sobre a composição química da própolis começaram no início do século XX (KUROPATNICKI, SZLISZKA & KROL, 2013). Esta substância tem um arranjo complexo, considerando o tipo de abelha que a produziu, a origem e duração da coleta, e a sua ação é dependente do tempo (PEREIRA et al., 2011). As variações climáticas podem induzir mudanças na concentração de compostos bioativos de plantas, com conseqüentes alterações na atividade biológica dos vários tipos de própolis (ISLA et al., 2012; JORGE et al., 2008). Em países como o Brasil, onde os climas equatorial, tropical e subtropical são predominantes, a origem da planta e a composição química da própolis são as mais variadas possíveis. A sua composição não é fixa e



varia consideravelmente de região para região, juntamente com a vegetação (MARCUCCI et al., 2001).

Este produto natural apresenta ponto de fusão variável, entre 60 a 70°C, chegando a atingir 100°C. É uma substância dura, quebradiça quando fria e que se torna flexível quando submetida a aquecimento. Devido à grande diversidade de própolis no Brasil, são classificados 13 tipos a partir de várias características, tais como, localização geográfica, perfil físico-químico e planta de origem; sendo encontrados cinco grupos na região Sul, um no Sudeste e sete na região Nordeste do Brasil, como mostra o quadro 1 (PARK et al., 2002).

**Quadro 1 – Identificação dos 13 tipos diferentes de própolis no Brasil com base em suas características físico-química e localização geográfica**

<b>Grupos</b>	<b>Cor</b>	<b>Origem da própolis</b>
<b>G1 (RS5)</b>	Amarelo	Sul
<b>G2 (RS1)</b>	Marrom	Sul
<b>G3 (PR7)</b>	Marrom escuro	Sul
<b>G4 (PR8)</b>	Marrom	Sul
<b>G5 (PR9)</b>	Marrom esverdeado	Sul
<b>G6 (BA11)</b>	Marrom avermelhado	Nordeste
<b>G7 (BA51)</b>	Marrom esverdeado	Nordeste
<b>G8 (PE5)</b>	Marrom escuro	Nordeste
<b>G9 (PE3)</b>	Amarelo	Nordeste
<b>G10 (CE3)</b>	Amarelo escuro	Nordeste
<b>G11 (PI11)</b>	Amarelo	Nordeste
<b>G12 (SP12)</b>	Verde ou marrom esverdeado	Sudeste
<b>G13 (AL)</b>	Vermelha	Nordeste

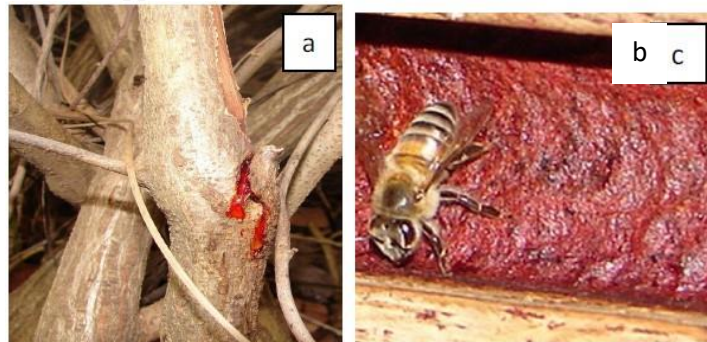
Fonte: Adaptado de Toreti et al., 2013

As própolis do tipo 6 apresentam uma composição química que difere dos demais tipos, especialmente pela ausência de flavonóides e pela presença de compostos de natureza mais apolar (CABRAL et al., 2009). A própolis da região sudeste do Brasil, do tipo verde, é proveniente da planta *Baccharis dracunculifolia*, conhecida popularmente como alecrim-do-campo e é uma das mais bem conceituadas no mercado internacional (FERNANDES-SILVA et al., 2013; MACHADO et al., 2012; SIMÕES-AMBROSIO et al., 2010).

Entre todos os tipos de própolis, a de cor vermelha, encontrada no Nordeste do Brasil, tem se destacado devido às suas propriedades, chegando a valer cinco vezes mais que a própolis verde (CABRAL et al., 2009; FREIRES, DE ALENCAR & ROSALEN, 2016; TRUSHEVA et al., 2006). De 2010 a 2012 o preço de 1 kg de própolis vermelha brasileira *in natura* aumentou mais de 50% no mercado internacional (SCHIMDT et al., 2014).

Até o ano de 2007, a mesma não tinha sido encontrada em outro lugar do Brasil, a não ser no estado de Alagoas, especificamente na cidade de Maceió (SILVA et al., 2007). Atualmente pode ser encontrada também nos estados de Sergipe, Paraíba, Pernambuco e Bahia, em regiões de manguezais (PARK et al., 2002; SILVA et al., 2007). A principal origem botânica foi identificada como *Dalbergia ecastophyllum* (*D. ecastophyllum*) (L) Taub. (*Fabaceae*), uma planta leguminosa popularmente conhecida como 'rabo-de-bugio' e que cresce abundantemente no estado alagoano (DAUGSCH et al., 2008; DE MENDONÇA et al., 2015; SILVA et al., 2007).

**Figura 1 –a) Exsudação da resina vermelha pela *Dalbergia ecastophyllum* (L) Taub; b) própolis vermelha produzida pelas abelhas *Apis mellifera***



**Fonte – Mourão, 2013**

Mais de 300 componentes foram relatados em amostras de própolis vermelha (RUFATTO et al., 2017). Estudos recentes que buscavam caracterizar este tipo de própolis encontraram moléculas, como elemicina, isoelemicina, metil isoeugenol, metil eugenol, formononetina, bioquanina A, isoliquiritigenina, liquiritigenina, medicarpin, homopteropano, quercetina e vestitol, que permitem sua distinção de outros tipos de própolis brasileira (OZAN et al., 2007; TRUSHEVA et al., 2006). Além disso, a presença de dois pigmentos de flavanóis, Retusapurpurina A e Retusapurpurina B, concedem sua característica de identidade vermelha (PICCINELLI et al., 2011). A estrutura de grande parte dos compostos da própolis vermelha nunca foi relatada em outros 12 tipos de própolis brasileira, o que faz com que esta seja única em se tratando de composição química (FREIRES, DE

ALENCAR & ROSALEN, 2016), embora própolis vermelha de diferentes zonas tropicais possua semelhanças em sua composição (PICCINELLI et al., 2011).

O primeiro relato de isoflavonoides em própolis brasileiras, bem como de substâncias glicosiladas, foi realizado através da própolis vermelha (RIGHI, 2008). Os isoflavonoides são metabólitos secundários de plantas com diversos efeitos biológicos e farmacológicos, tais como, antimicrobiano, antioxidante, antiinflamatório (CORNWELL et al., 2004). Além disso, esta própolis se destaca em relação ao teor de fenóis e de flavonoides totais, a quem se atribui grande parte de suas atividades biológicas (FUNARI & FERRO, 2006).

Em 2012, a própolis vermelha de Alagoas e seu extrato receberam um certificado de Indicação Geográfica (IG) pelo Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI). Esta indicação identifica um produto como originário de país, cidade, região ou localidade de seu território, quando determinada qualidade, reputação ou outra característica do produto seja essencialmente atribuída à sua origem geográfica. Desta forma, Alagoas recebeu certificado internacional como o único produtor desse tipo de própolis em todo o mundo (MAPA, 2012).

A própolis vermelha possui diversas propriedades biológicas, como atividade antimicrobiana (CABRAL et al. 2009; DAUGSCH et al., 2008), citotóxica (DE MENDONÇA et al., 2015; LI et al., 2008), antioxidante (FROZZA et al., 2014; RIGHI et al., 2011; TRUSHEVA et al., 2006;), antiinflamatória (BEZERRA et al., 2017; BUENO-SILVA et al., 2017). Porém, este produto natural vem se destacando devido a sua atividade leishmanicida (AYRES et al., 2007; AYRES et al., 2011; DO NASCIMENTO et al., 2016; MACHADO et al., 2007; PONTIN et al., 2008), revelando resultados positivos em diversos modelos experimentais contra alguns tripanossomatídeos de importância médica (DA SILVA et al., 2016), além de ser amplamente utilizada na medicina popular como cicatrizante de feridas, acelerando a regeneração tecidual e reduzindo o tempo de cicatrização (BARBOSA et al., 2009; OLCZYCK et al., 2013). Algumas pesquisas conseguiram mostrar que o extrato etanólico de própolis também possui propriedades anti-inflamatórias sendo capaz de desempenhar efeitos protetores contra toxicidade em órgãos, como por exemplo, o fígado (DA SILVA et al., 2016).

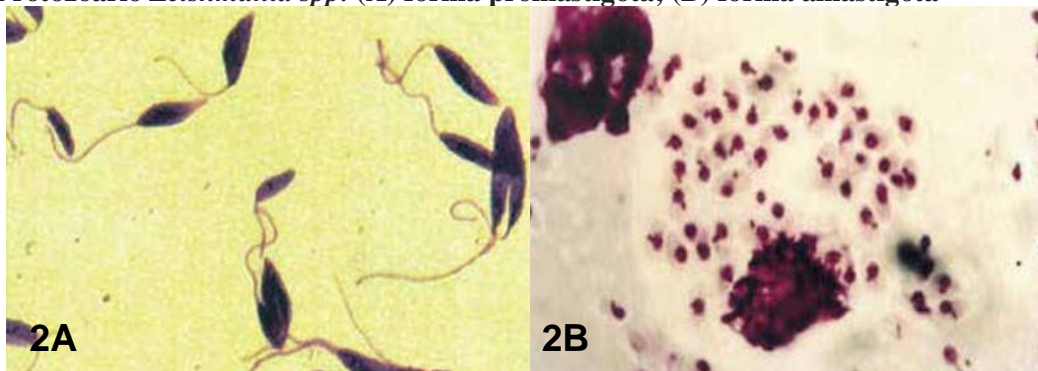
## **2.2 Aspectos gerais das leishmanioses**

As leishmanioses são um complexo de doenças parasitárias que se encontram em partes dos trópicos, subtropicais e do sul da Europa (CDC, 2013, OMS, 2017). É classificada como doença

tropical negligenciada e é amplamente ignorada nas discussões sobre prioridades de doenças tropicais (HOTEZ et al., 2004; HOTEZ et al., 2006; CDC, 2017). Segundo a Organização Mundial da Saúde (2017), as leishmanioses são chamadas de doenças negligenciadas, porque ocorrem em sua grande maioria em países pobres.

A *Leishmaniaspp* é um protozoário que pertence à família *Trypanosomatidae*, um parasito intracelular obrigatório das células do sistema fagocítico mononuclear, constituindo duas formas principais: uma flagelada ou promastigota, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor, e outra aflagelada ou amastigota, observada nos tecidos dos hospedeiros vertebrados (Figura 2) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

**Figura 2 – Protozoário *Leishmania spp.* (A) forma promastigota; (B) forma amastigota**



Fonte: Ministério da Saúde, 2017

Os vetores desta parasitose são insetos denominados flebotomíneos, pertencentes à Ordem *Diptera*, Família *Psychodidae*, Subfamília *Phlebotominae*, Gênero *Lutzomyia*, conhecidos popularmente, dependendo da localização geográfica, como mosquito-palha, birigui, entre outros (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017) (Figura 3). Há cerca de 30 espécies de mosquitos flebotomíneos, e estes, são mais ativos durante as horas do crepúsculo (noite) (CDC, 2017). Cerca de 600 espécies de *Phlebotominae* são conhecidas, e a maior parte pertence ao gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo (ORYAN & AKBARI, 2016).

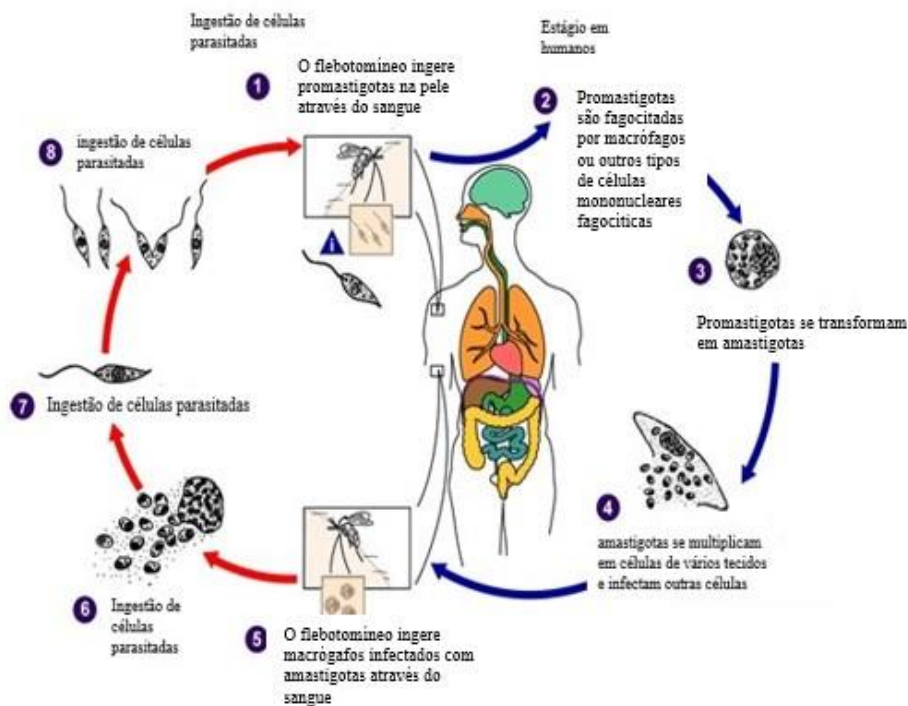
**Figura 3 – Vetor da leishmaniose**



Fonte: disponível em <<https://www.pereirabarreto.sp.gov.br/noticias/23-saude/4434-popula%C3%A7%C3%A3o-deve-estar-atenta-aos-focos-criadouros-do-mosquito-transmissor-da-leishmaniose.html>> Acessado em 31 out. 2017.

O ciclo de vida da *Leishmania spp* inicia-se quando uma fêmea ingere formas amastigotas do parasito durante o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado infectado. Após a picada, as amastigotas são ingeridas juntamente com os macrófagos e sangue, livres ou dentro das células hospedeiras. Dentro do intestino do inseto vetor o parasito se multiplica e se desenvolve em promastigotas metacíclicas, forma infectante para os hospedeiros vertebrados. A transmissão do parasito ocorre quando o flebotomíneo infectado faz um segundo repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado. Neste momento as formas metacíclicas são inoculadas na pele do vertebrado juntamente com a saliva (CDC, 2017; KAYE& SCOTT 2011) (Figura 4).

**Figura 4 – Ciclo de vida da Leishmania, mostrando fase do ciclo no hospedeiro invertebrado (flebotomíneo) e vertebrado (mamífero).**



**Fonte: Centro de controle e prevenção de doenças (2017, tradução nossa)**

Esta parasitose pode apresentar duas formas clínicas principais: a forma cutânea (Leishmaniose Tegumentar – LT), conhecida nas Américas como Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), que causa feridas na pele e a forma visceral (Leishmaniose Visceral - LV), que afeta vários órgãos internos, geralmente baço, fígado e medula óssea (CDC, 2017; OMS, 2010).

### 2.3 Leishmaniose Tegumentar

A Leishmaniose Tegumentar (LT) é uma doença infecciosa, não contagiosa, que acomete pele e mucosas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Possui alta incidência e ampla distribuição geográfica, havendo a possibilidade de, com a sua evolução da forma cutânea para a mucosa, assumir formas que podem gerar lesões destrutivas e desfigurantes, repercutindo no campo psicossocial do indivíduo (GONTIJO & CARVALHO, 2003). A LT é classificada como uma infecção de categoria 1 (emergente e não controlada) (DE VRIES et al., 2015).

A apresentação clínica da doença depende tanto da espécie do parasito como da resposta imune do hospedeiro. Na forma cutânea, as espécies envolvidas variam de acordo com a localização geográfica, conforme demonstrado na quadro 2 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

**Quadro 2 – Principais espécies de *Leishmania* que causam Leishmaniose Tegumentar em humanos**

Doença	Espécies
Velho Mundo, subgênero <i>Leishmania</i>	
<b>Leishmaniose Tegumentar</b>	<i>Leishmania major</i> , <i>Leishmania tropica</i> e <i>Leishmania aethiopica</i>
Novo Mundo, subgênero <i>Leishmania</i>	
<b>Leishmaniose Tegumentar</b>	<i>Leishmania infantum</i> , <i>Leishmania mexicana</i> , <i>Leishmania pifanoi</i> e <i>Leishmania amazonensis</i>
Novo Mundo, subgênero <i>Viannia</i>	
<b>Leishmaniose Tegumentar</b>	<i>Leishmania braziliensis</i> , <i>Leishmania guyanensis</i> , <i>Leishmania panamensis</i> e <i>Leishmania peruviana</i>

**Fonte:** Adaptado de KAYE & SCOTT, 2011

A LT causa lesões na pele, que podem persistir por meses, e algumas vezes, por anos. Estas lesões geralmente evoluem de pápulas para placas nodulares e lesões ulcerativas, com uma borda elevada e depressão central, que podem ser cobertas por crosta, e há ainda algumas que persistem como nódulos. As lesões geralmente são indolores, mas podem ser dolorosas, se estiverem em processo secundário, com infecções de bactérias ou ainda, se estiverem próximas a uma articulação (CDC, 2017).

**Figura 5 – Lesão cutânea de leishmaniose tegumentar**



**Fonte: Ministério da Saúde, 2010**

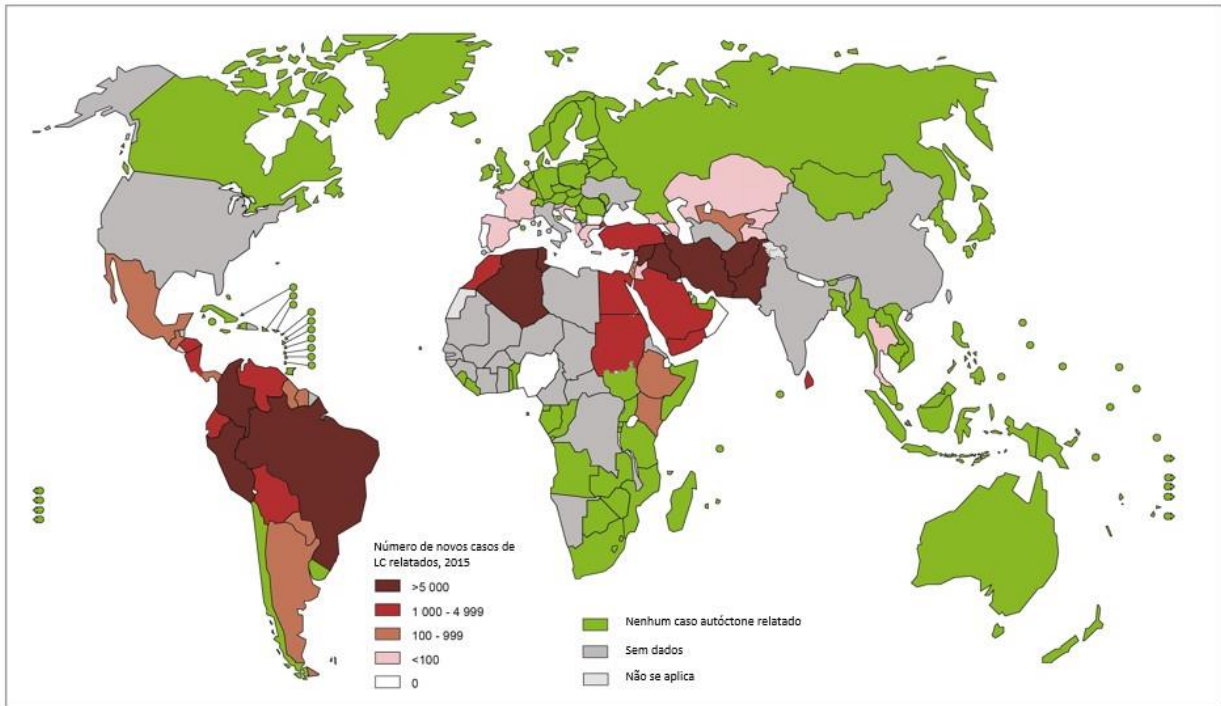
### 2.3.1 Dados epidemiológicos da LT

A LT constitui um problema de saúde pública em 85 países, distribuídos em quatro continentes (Américas, Europa, África e Ásia), sendo mais comum nas áreas rurais do que nas urbanas, porém pode ser encontrada nas proximidades de algumas cidades. O número de novos casos não é conhecido com certeza, porém o registro anual para a forma cutânea da doença é de aproximadamente 0,7 a 1,3 milhão. É considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) uma das seis mais importantes doenças infecciosas, pois possui capacidade de causar deformidades (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

No Velho Mundo (Hemisfério Oriental), a leishmaniose é encontrada em algumas partes da Ásia, Oriente Médio, África e no sul da Europa. Não é encontrado na Austrália ou nas ilhas do Pacífico. No Novo Mundo (Hemisfério Ocidental), é encontrado em algumas partes do México, América Central e América do Sul, exceto no Chile e Uruguai. Casos ocasionais de LT ocorreram no Texas e Oklahoma (CDC, 2017). O Brasil é um dos dez países que possui 75% da incidência global da doença (ALVAR et al., 2012), porém, não só no nosso país, assim como em outros países do Novo Mundo, a leishmaniose é considerada um problema de Saúde Pública (GONTIJO & CARVALHO, 2003).



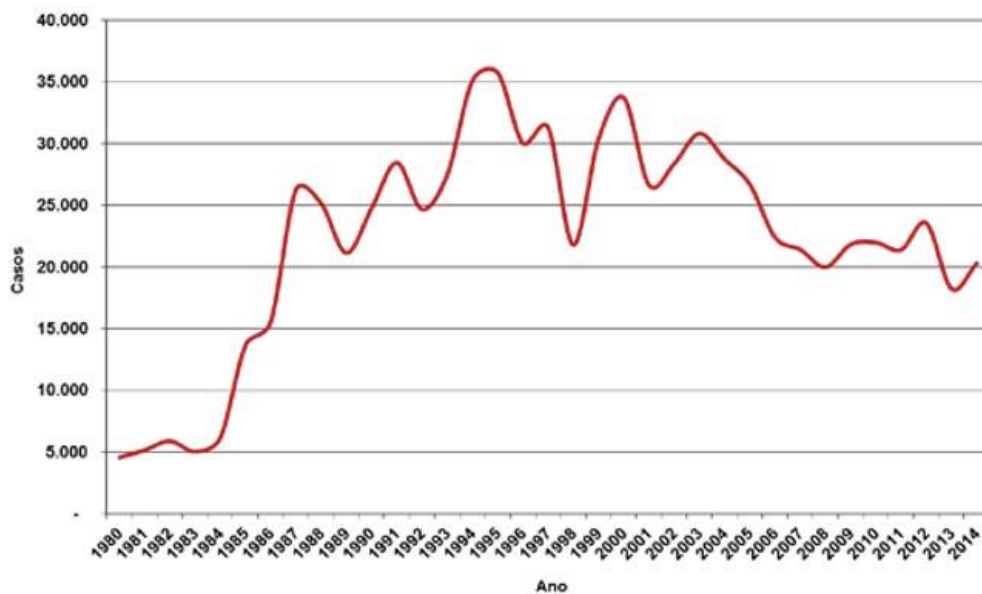
**Figura 6 – Mapa mundial com casos relatados de Leishmaniose Tegumentar**



**Fonte : Organização Mundial da Saúde (2015, tradução nossa)**

A partir dos anos 80, observou-se um aumento no número de casos registrados, variando de 3.000 (1980) a 35.748 (1995). Houve também picos de transmissão a cada cinco anos, apresentando tendência no aumento do número de casos, a partir do ano de 1985, quando se solidifica a implantação das ações de vigilância e controle da LT no país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

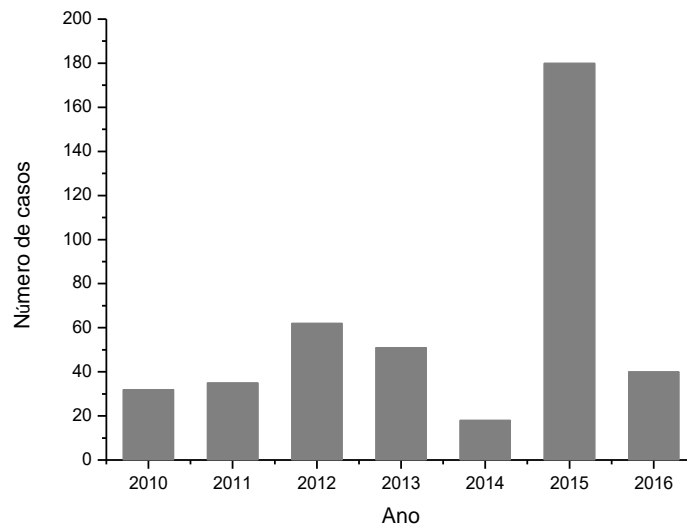
**Figura 7 – Casos confirmados de leishmaniose tegumentar no Brasil – 1980 a 2014**



**Fonte: Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde (SVS/MS), 2017**

Na década de 90, a região Nordeste alcançou um número de 12.428 casos de LT, porém o cenário se modificou e nos últimos cinco anos, a região Norte vem liderando em relação a maior quantidade de número de casos, chegando a atingir no ano passado 5.075, seguido da região Nordeste com 3.166. Em contrapartida, a região Norte apresentou coeficiente de detecção de 28,6 no ano de 2015, enquanto a região Nordeste teve apenas 5,6. O estado de Alagoas, vem mostrando um número relativamente baixo de casos quando comparado com outros municípios da região Nordeste, embora tenha apresentado um pico de 180 casos no ano de 2015, diminuindo para apenas 40 no ano de 2016, como pode ser mostrado na figura 8 abaixo (SINAN, 2016).

**Figura 8 – Casos de leishmaniose tegumentar no município de Alagoas, dos anos 2010 a 2016**



**Fonte: A autora**

### 2.3.2 Diagnóstico e Tratamento da LT

A confirmação laboratorial do diagnóstico é obtida por meio da visualização de parasitas da *Leishmania* em tecido infectado, através de exame microscópico de amostras coradas, técnicas de cultura ou métodos moleculares, com a detecção do kDNA de *Leishmania spp.* utilizando sistemas de primers específicos (CDC, 2017; PAIVA-CAVALCANTI et al., 2013, 2015). A manifestação clínica com testes parasitológicos confirmam o diagnóstico e os testes sorológicos têm valor limitado (OMS, 2017).

O diagnóstico clínico da LT pode ser feito baseado nas características das lesões associadas à anamnese, onde os dados epidemiológicos são de grande importância. As formas tegumentares do

Novo Mundo compreendem uma síndrome cujas manifestações clínicas dependem de alguns fatores, como a espécie de *Leishmania* envolvida e a relação do parasita com seu hospedeiro (SARAVIA et al., 1989), além disso, essa forma da doença produz um amplo espectro de lesões, o que torna o diagnóstico clínico nem sempre simples ou imediato (GONTIJO & CARVALHO, 2003).

Os antimoniais pentavalentes (SbV) têm sido utilizados desde a década de 1940 como agentes terapêuticos de primeira linha para LT em todo o mundo (GONZÁLEZ et al., 2008), embora possam causar desde efeitos adversos comuns, como artralgia, mialgia, dor de cabeça (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017), até efeitos mais severos como alta cardiotoxicidade (MATOUSSI et al., 2007), nefrotoxicidade (ZAGHLOUL & AL-JASSER, 2004) e pancreatite (SHAHIAN & ALBORZI, 2009), além da necessidade de administração parenteral durante semanas, o que leva a uma baixa adesão do paciente (FRÉZARD et al., 2009). O tratamento com SbV requer monitorização laboratorial frequente e complica o uso em áreas com recursos e infraestrutura reduzidos (BRITO et al., 2017). Existem no mercado atualmente duas formulações disponíveis, o antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime<sup>®</sup>, Aventis, França), utilizado no Brasil, por exemplo, e o estibogluconato de sódio (Pentostam<sup>®</sup>, Glaxo Wellcome, Reino Unido), utilizado nos Estados Unidos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010; CDC, 2017).

A Organização Mundial de Saúde indica que a dose desse antimonial seja calculada em miligramas de antimônio pentavalente por quilograma do peso corporal por dia (mg SbV/Kg/dia), objetivando a padronização da terapia. A eficácia dos antimoniais pentavalentes depende de alguns fatores, tais como: espécies de *Leishmania*, presença de linhagens resistentes e esquema terapêutico (MOOSAVIAN et al., 2014).

O mecanismo de ação dos antimoniais não é bem conhecido (KIP et al., 2017). Atualmente existem o modelo pró-fármaco e o SbV ativo. No modelo pró-fármaco, os compostos de SbV são pró-fármacos desempenhando sua atividade contra o parasita da *Leishmania* após a redução ao antimonial trivalente (SbIII) nas células hospedeiras (BAIOCCO et al., 2009). O SbIII induz a morte celular programada pela ativação do estresse oxidativo e aumento dos íons  $Ca^{2+}$  intracelulares (MOOKERJEE et al., 2006; FRÉZARD et al., 2009). Pelo modelo SbV ativo, este semi-metal tem atividade leishmanicida intrínseca, levando finalmente à inibição da DNA topoisomerase I (FRÉZARD et al., 2009).

Outra forma de tratamento é quando existem casos de LT sem risco de disseminação ou que tenham a possibilidade de se transformar em forma mucosa, a terapia local pode ser utilizada, a

dependem do número, localização e características das lesões na pele. Alguns exemplos de terapias locais incluem crioterapia (com nitrogênio líquido), termoterapia (uso de calor de radiofrequência de campo atual localizado), administração intralésional de SbV (até o momento, sem protocolo para Pentostam<sup>®</sup>) e uso tópico de paromomicina (como uma pomada contendo 15% de paromomicina/12% de cloreto de metilbenzetônio em parafina branca macia)(CDC, 2017).

Devido a todos os problemas existentes com o fármaco de primeira escolha, muitas tentativas estão sendo realizadas no intuito de desenvolver medicamentos com baixo custo e consequentemente reduzir os efeitos colaterais secundários, porém, ainda não há uma diminuição considerável de morbidade causada por esta doença (AKBARI et al., 2017). A LT é um problema de saúde especialmente em países que estão em desenvolvimento e, portanto, não proporciona motivação comercial suficiente para que as empresas farmacêuticas desenvolvam medicamentos com um custo mais acessível (GHAFARPASAND et al., 2016).

Um fármaco ideal é aquele que consegue ser eficaz em doses mínimas, com baixo custo, sem efeitos colaterais adversos, sem causar teratogenicidade, que não necessite de hospitalização do paciente e que não induza a resistência medicamentosa. Desta forma, surgiram poucas melhorias no tratamento das leishmanioses nos últimos anos e os antinômias pentavalentes continuam sendo utilizados como primeira escolha (ORYAN, 2016).

Algumas falhas podem ocorrer durante o tratamento com SbVs, devido a idade do paciente, duração da doença e número ou local das lesões cutâneas (LLANOS-CUENTAS et al., 2008). Quando ocorrem estas falhas, outros fármacos como a anfotericina B, paromomicina e pentamidina devem ser utilizados como uma segunda alternativa (WIWANITKIT et al., 2012). A miltefosina é um fármaco desenvolvido para o tratamento contra o câncer, porém, desde 2004, também tem sido utilizado para o tratamento de leishmaniose tegumentar na Alemanha (KIP et al., 2017). Para as mulheres que estão amamentando ou estão grávidas, a FDA aprovou este medicamento de uso oral para tratamento de LT, porém seu uso é específico para infecção causada por três espécies do Novo Mundo do subgênero *Viannia*, que são, *Leishmania (V.) braziliensis*, *L. (V.) panamensis* e *L. (V.) guyanensis* (CDC, 2017).

A anfotericina B é um antifúngico que possui atividade leishmanicida efetiva frente a diferentes espécies de *Leishmania* e é geralmente administrado como tratamento de segunda escolha para a leishmaniose (AKBARI et al., 2017). Este medicamento possui efeitos colaterais como a nefrotoxicidade e a hipocalcemia, surgindo a formulação lipídica que diminuiu significativamente sua toxicidade renal e toxicidade relacionada à infusão. A anfotericina B liga-se ao ergosterol na

membrana celular, levando à formação de poros, ao vazamento de fluido e morte celular (KIP et al., 2017).

A paromomicina é um aminoglicosídeo natural, que difere da neomicina apenas por uma única substituição do NH<sub>2</sub> por OH na posição 6', além de possuir atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e atividade leishmanicida. Este fármaco consegue inibir a síntese da proteína pertencente ao protozoário através da ligação à subunidade ribossômica 30S, que resulta no acúmulo de complexos ribossômicos anormais 30S-50S e causa morte celular (KIP et al., 2017; SHALEV et al., 2015).

Nos Estados Unidos, a pentamidina é utilizada comumente para o tratamento da leishmaniose tegumentar, no entanto, este fármaco possui algumas limitações, tais como, toxicidade irreversível e eficácia variável (CDC 2017).

Nos últimos anos observou-se grande empenho dedicado a pesquisa de novos fármacos em associação ou não para esta parasitose, porém, os tratamentos ainda são baseados no uso de antimoniais pentavalentes, anfotericina B, miltefosina, pentamidina ou paromomicina, onde nenhum deles é considerado ideal (VELÁSQUEZ et al., 2017).

Ainda em busca de melhorias referentes ao tratamento de LT, diversas novas combinações de fármacos estão atualmente sendo testadas (KIP et al., 2017). A terapia combinada busca um aumento da tolerabilidade, da compatibilidade e da resposta imunológica, além de redução do período de tratamento (JHA, 2006; KIP et al., 2017).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Investigar o efeito da própolis vermelha de Alagoas para uso tópico ou oral na Leishmaniose Tegumentar em co-terapia com Glucantime®.

#### **3.2 Ojetivos específicos**

- Obter e padronizar o extrato bruto de própolis vermelha de Alagoas;
- Elaborar e caracterizar extrato hidroalcoólico de própolis vermelha de Alagoas;
- Avaliar a atividade antioxidante;
- Elaborar formulação semissólida a partir do extrato bruto de própolis vermelha de Alagoas e avaliar a sua estabilidade;
- Avaliar a atividade leishmanicida e citotoxicidade in vitro do extrato bruto sobre as formas promastigotas e amastigotas;
- Avaliar a atividade leishmanicida in vivo da formulação de uso tópico, em co-terapia ou não, etapa pré-clínica;
- Avaliar a atividade leishmanicida e citotoxicidade in vitro do extrato hidroalcoólico sobre as formas promastigotas e amastigotas;
- Avaliar a atividade leishmanicida in vivo do extrato hidroalcoólico, em co-terapia ou não, etapa pré-clínica.

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1 Coleta e armazenamento da própolis vermelha de Alagoas**

A própolis foi adquirida da apícola Fernão Velho, em parceria com a União dos Produtores de Própolis Vermelha do Estado de Alagoas – UNIPROPOLIS. As amostras foram coletadas e acondicionadas em sacos plásticos em freezer (-18°C) até sua utilização.

### **4.2 Obtenção e padronização do extrato bruto de própolis vermelha de Alagoas**

Utilizou-se 250 g de própolis bruta, para obter o constituinte ativo, através de maceração em temperatura ambiente em 1 L de etanol 70% (Anidrol), 3 vezes, por 48 horas cada. O sobrenadante foi retirado com auxílio de uma pipeta e concentrado em rotaevaporador (IKA® RV10, Alemanha) em temperatura entre 40-50°C, pressão 650 mmHg e velocidade 80 rpm para remoção do solvente e, então, foi obtido o extrato bruto.

### **4.3 Elaboração e caracterização de extrato hidroalcolico de própolis vermelha de Alagoas**

Para os seguintes testes foi utilizado álcool absoluto (Anidrol): Teor de flavonoides, teor de fenólicos, atividade antioxidante e pesquisa de contaminantes. Para as seguintes determinações foi utilizado álcool de cereais a 70% (Universo das essências Ltda): Teor de extrato, teor de ceras, atividade de oxidação, teor alcoólico, análise de picos característicos, solubilidade em acetato de chumbo e solubilidade em hidróxido de sódio. Esses testes foram essenciais para caracterização do extrato hidroalcolico de PVA e seguiu a Instrução Normativa 03/2001/SDA/MAPA para verificação de todos os requisitos mínimos, tais como: características sensoriais, físico-químicas e presença de contaminantes.

#### **4.3.1 Características sensoriais**

Foram realizadas as análises sensoriais exigidas pelo Ministério da Agricultura para fixação de identidade e qualidade de extrato de própolis, sendo elas: aroma, cor, sabor e aspecto.

#### **4.3.2 Características físico-químicas**

#### 4.3.2.1 Teor de extrato seco

A partir do produto final elaborado, foi retirada uma alíquota de 1 mL e levada para uma balança semi-analítica com infravermelho (Shimadzu MOC63u), para análise de umidade. A análise foi realizada em triplicata.

#### 4.3.2.2 Teor de ceras

Para determinar o teor de ceras foi utilizada a metodologia descrita pela AOAC (1992), com algumas modificações. Foram pesados 5 g da amostra que foi mantida sob refrigeração, por 8h. Após este período de tempo, foram retirados 2,5 g desta amostra (P1), colocados em béquer e filtrados em papel filtro previamente seco em estufa (De Leo) (2h a 100°C) (P2). Em seguida, o béquer e o papel filtro foram lavados com 5mL de álcool de cereais 70% refrigerado, por três vezes. Depois de filtrado, o papel filtro foi seco em temperatura ambiente por 12h, sendo então colocado em estufa a 50°C por 15min. Após, o papel filtro foi retirado da estufa, seco em dessecador e pesado (P3). Para determinar o teor de ceras foi utilizada a equação abaixo:

**Equação 1-Fórmula para determinar o teor de ceras do extrato hidroalcoólico de PVA**

$$\text{Ceras (\%)} = \frac{P3 - P2}{P1} \times 100$$

**Fonte: A autora**

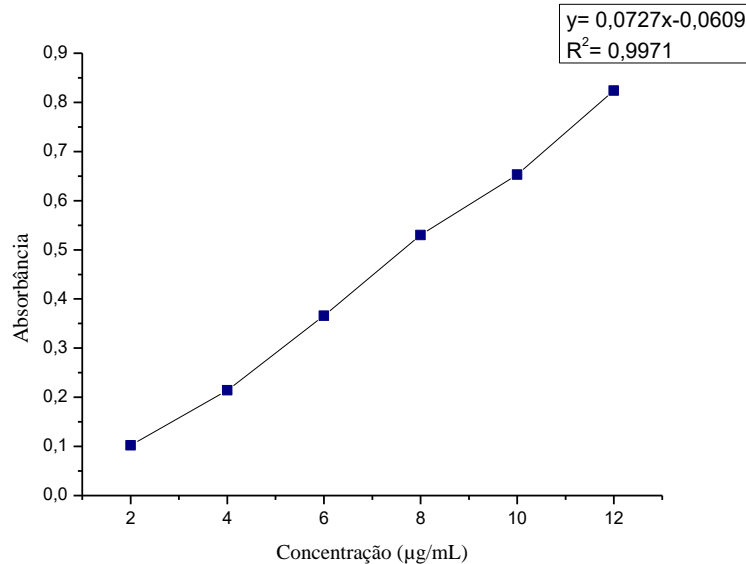
#### 4.3.2.3 Compostos flavonoides

A determinação de flavonoides totais foi baseada no método de cloreto de alumínio, descrito por Do Rio (1996). Para isso, construiu-se previamente uma curva padrão de calibração partindo de uma solução estoque de quercetina (Sigma-Aldrich) de 200 µg/mL utilizando-a em diferentes concentrações. Em um balão volumétrico de 5 mL, contendo previamente 4 mL de metanol foi adicionado uma alíquota de acordo com cada concentração de quercetina e 0,1 mL da solução de cloreto de alumínio (5%) (Dinâmica Química Contemporânea Ltda). O volume final foi completado com metanol (Química moderna), e em seguida a solução foi homogeneizada. Após o tempo de 30 minutos foi realizada a leitura no espectrofotômetro (UV-mini-1240), com



comprimento de onda de 425 nm. Calculou-se a equação da reta pelo método dos mínimos quadrados.

**Figura 9–Curva padrão de quercetina, com sua respectiva equação da reta**



**Fonte: A autora**

Após a elaboração da curva de calibração, uma solução estoque de extrato de PVA foi preparada em etanol P.A. (Anidrol) numa concentração de 4000 µg/mL. Adicionou-se uma alíquota de 100 µg/mL do extrato de PVA em um balão volumétrico de 5 mL, contendo previamente 4 mL de metanol. A seguir, utilizou-se a mesma metodologia descrita acima. Os valores das absorbâncias obtidos com as leituras das amostras foram substituídos na variável y, da equação da reta da curva de calibração. A análise foi realizada em triplicata. A quantidade de flavonoides totais presentes nas amostras analisadas foi calculada pela equação 2.

**Equação 2– Fórmula para encontrar a porcentagem de flavonoides e fenólicos totais nas amostras de própolis**

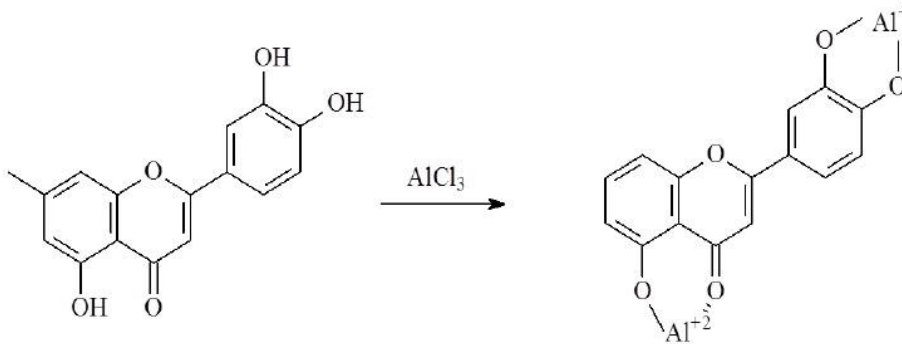
$$\% = \frac{C}{M} \times 100$$

**Legenda: C = concentração de quercetina/ácido gálico em µg/mL;  
M = Massa da amostra em µg/mL**

Esse método para quantificar flavonoides na própolis se baseia na formação de um complexo entre o Al (III) e os grupos carbonila e hidroxila dos flavonoides (ÁSSIMOS, 2014), como ilustra a figura 10. O desvio para maiores comprimentos de onda e uma intensificação da absorção na análise espectrofotométrica ocorre devido à formação do complexo, sendo possível

determinar a quantidade de flavonoides. Dessa forma, evita-se a interferência de outras substâncias fenólicas (MARCUCCI, 1998).

**Figura 10 – Reação da formação do complexo entre o Al (III) e os flavonoides**

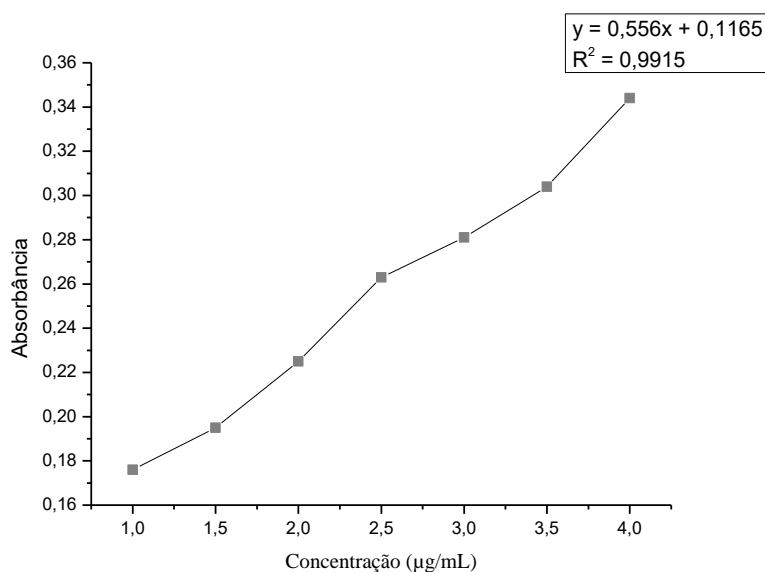


**Fonte: Ássimos, 2014**

#### 4.3.2.4 Compostos fenólicos

A determinação do conteúdo total de fenóis foi baseada no método de Folin-Ciocalteu (RFC) (Sigma-Aldrich), descrito por Do Rio (1996). Primeiramente, construiu-se uma curva padrão de calibração partindo de uma solução estoque de ácido gálico (Dinâmica química contemporânea Ltda) de 100 µg/mL. Em um balão volumétrico de 5 mL contendo previamente 3,5 mL de água deionizada foi adicionado uma alíquota correspondente a cada diluição e logo após adicionou-se 0,4 mL de RFC. Após homogeneização, adicionou-se 0,6 mL da solução saturada de carbonato de sódio (20%) (Êxodo<sup>®</sup> científica) e completou-se com água até o volume final do balão. A reação ocorreu no escuro por 2 horas para que ocorresse a oxidação de fenóis, observada através da mudança de coloração, de esverdeado para azul. A leitura foi realizada no espectrofotômetro (UV-mini-1240), no comprimento de onda de 760 nm. Calculou-se a equação da reta pelo método dos mínimos quadrados.

**Figura 11 – Curva padrão de ácido gálico, com sua respectiva equação da reta**



**Fonte: A autora**

Após a elaboração da curva de calibração, a partir da solução estoque de extrato de PVA, preparada em etanol P.A. (Anidrol) numa concentração de 4000 µg/mL, adicionou-se uma alíquota de 50 µg/mL do extrato de PVA em um balão volumétrico de 5 mL, contendo previamente 3,5 mL de água deionizada. Depois, utilizou-se a mesma metodologia descrita acima. Os valores das absorbâncias obtidos com as leituras das amostras foram substituídos na variável y, da equação da reta da curva de calibração. A análise foi realizada em triplicata. A quantidade de fenóis totais presentes nas amostras analisadas também foi calculada pela equação 2.

O método utilizado para o cálculo do teor de substâncias fenólicas totais é baseado em uma reação de óxido-redução, na qual o íon fenolato é oxidado em meio alcalino, enquanto ocorre a redução no reagente de Folin-Ciocalteu para uma solução azul (o cromóforo), que absorve fortemente a 760 nm.

#### 4.3.2.5 Atividade de oxidação

Em um becker de 100 mL, foram pipetados 2 mL do extrato e adicionados 48 mL de água destilada, sendo agitados com bastão de vidro. Em um tubo de ensaio de 15 mL, foram pipetados 0,5 mL do diluído, 0,5 mL de água destilada, 1 mL de ácido sulfúrico a 20%, homogeneizando-os e resfriando-os em banho de gelo até temperatura de 18°C. Em seguida, com auxílio de uma micropipeta, foi acrescentado 50 mL de permanganato de potássio 0,1 N e ligado o cronômetro,

observando o desaparecimento da cor vermelha contra um fundo branco, anotando-se o tempo decorrido. O teste foi feito em duplicata (DA SILVA et al., 2006).

#### 4.3.2.6 Teor alcóolico

Foi retirados 500 mL do extrato hidroalcoólico de PVA e colocado em uma proveta, para verificação de teor alcóolico através de alcoômetro.

#### 4.3.2.7 Análise de picos característicos através do espectro de absorção de radiações UV-Vis

Uma alíquota de 1 mL foi pipetada em uma microplaca e levada para leitor de placas (Flextation<sup>®</sup> 3, EUA) onde foi realizada varredura de 200 a 400 nm para observação de picos característicos de flavonoides.

#### 4.3.2.8 Solubilidade em acetato de chumbo

Para determinar a solubilidade em acetato de chumbo, 0,5 mL de solução de extrato de PVA foi colocado em um tubo de ensaio contendo 0,5 mL de acetato de chumbo a 10%. A solução foi agitada e mantida em repouso por um período de 3 minutos, para observação de formação de precipitado. Este ensaio visa verificar a homogeneidade de partículas do extrato numa solução salina. As análises foram realizadas em duplicata (AOAC, 1992).

#### 4.3.2.9 Solubilidade em hidróxido de sódio

Para determinar solubilidade em hidróxido de sódio, 0,5 mL de solução de extrato de PVA foi colocado em um tubo de ensaio contendo 0,5 mL de hidróxido de sódio a 50%. A solução foi agitada e mantida em repouso por um período de 3 minutos, para observação de formação de precipitado. O objetivo desta análise é verificar a homogeneidade das partículas do extrato numa base. As análises foram realizadas em duplicata (AOAC, 1992).

#### 4.3.3 Pesquisa de esporos *Paenibacillus larvae*

Essa etapa foi realizada utilizando a metodologia descrita na Portaria 248, de 30/12/1998, com algumas modificações. A solução do extrato de PVA foi levada para centrifugação a 3000 rpm

por 30 minutos. Após essa etapa, o sobrenadante foi descartado e o sedimento da amostra foi aquecido a 80°C por 10 minutos para eliminação das formas vegetativas de bactérias presentes que podem interferir no crescimento de *Bacillus larvae* e dificultar a seleção das colônias deste patógeno. As amostras foram colocadas em lâminas para e em placas com meio ágar chocolate, para coloração de Gram e verificação de crescimento de colônias, respectivamente. As análises foram feitas em duplicata.

#### 4.4 Avaliação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi determinada através da atividade de captura do radical livre DPPH (2-difenil-1-picrilideazil) (MOLYNEUX, 2004). DPPH é um radical estável em solução e este método é bastante utilizado para avaliação do potencial de eliminação de radicais livres de antioxidantes, através de transferência de elétrons simples ou por extinção radical via transferência de átomos de hidrogênio (XAVIER et al., 2017).

Para o preparo da solução pesou-se em balança analítica 1,6 mg de DPPH (Sigma-Aldrich) em tubo protegido da luz. Em seguida, realizou-se a sua transferência quantitativa para um balão volumétrico utilizando metanol como solvente e completando-se o volume final para 50 mL. A solução foi mantida em banho de gelo e ao abrigo da luz durante todo o uso.

Com auxílio de uma pipeta 2,7 mL da solução de DPPH foi colocado em cubeta de vidro óptico e adicionou-se 0,3 mL da solução de própolis, com a concentração final de 20 µg/mL. Essa solução foi preparada em etanol absoluto. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (UV-mini-1240), após 30 minutos, com comprimento de onda de 517 nm. O procedimento foi realizado em triplicata e utilizou-se metanol como branco. O percentual de redução do DPPH foi calculado pela equação 3.

#### Equação 3 – Fórmula para encontrar o percentual de redução para inibição do radical livre DPPH

$$\text{Redução \%} = \frac{A(\text{controle}) - (A\text{amostra}) \times 100}{A\text{controle}}$$

**Legenda:** Acontrole= Absorbância da solução de DPPH;

Aamostra= Absorbância da solução de própolis com DPPH após 30 minutos.

Para a determinação da cinética de captura do DPPH foi seguida a mesma metodologia descrita acima. Utilizou-se a equação citada anteriormente, em que foi obtido o percentual de redução do DPPH nos seguintes tempos: 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos.

#### **4.5 Preparação, desenvolvimento e caracterização de formulação semissólida**

O extrato bruto foi incorporado em pomada-base, contendo parafina e vaselina, na proporção de 3:7, respectivamente. A pomada foi preparada por fusão, a 70°C, e a porcentagem do composto ativo na formulação semissólida foi padronizada em 1%. Os produtos foram caracterizados por suas propriedades organolépticas (cor e odor), pH e viscosidade. Foi, ainda, preparada uma pomada base, sem o extrato bruto de própolis, como controle.

Para obtenção do pH, a pomada foi dispersa a 1% em propilenoglicol, com auxílio de aquecimento (40°C em banho-maria) e realizada leitura em potenciômetro (HANNA 41235, EUA) previamente calibrado.

Para determinação da viscosidade, o viscosímetro de Ostwald (SCHOTT CT 52, Alemanha) foi utilizado com os seguintes parâmetros: 8g da amostra, capilar com diâmetro de 200mm e temperatura de 55°C. O valor da viscosidade foi obtido pela equação abaixo.

**Equação 4 – Fórmula para encontrar o valor da viscosidade das formulações semissólidas desenvolvidas**

$$V = K \times t$$

**Legenda:** v= valor da viscosidade em mm<sup>2</sup>/s;

**K = constante de viscosidade da pomada;**

**t = tempo gasto pela pomada para percorrer a marcação do capilar em segundos**

##### **4.5.1 Avaliação da estabilidade**

Imediatamente após o preparo da pomada, foi realizado um teste preliminar de estabilidade em centrífuga (SIGMA 6-15, Alemanha), a 3500 rpm durante 30 minutos (ANVISA, 2004). Este teste foi determinante para o prosseguimento das análises. Uma vez aprovado na estabilidade preliminar, o acompanhamento dos produtos foi conduzido pelo teste de estabilidade em prateleira. A embalagem primária utilizada para a pomada foi uma bisnaga, cujo material era de polietileno e os ensaios de caracterização foram realizados em: 72 horas (amadurecimento da

pomada) e mensalmente pós-produção durante um período de 8 meses. A pomada foi armazenada em bisnaga, cujo material foi polietileno.

#### 4.6 Avaliação da atividade leishmanicida e citotoxicidade in vitro

Para determinar a concentração citotóxica para 50% das células ( $CC_{50}$ ) e a concentração que inibe em 50% o crescimento das formas promastigotas ( $IC_{50PRO}$ ) e amastigotas ( $IC_{50AMA}$ ), foi utilizado o extrato bruto de PVA. Primeiramente, formas promastigotas ( $5 \times 10^6$  cel/mL) cultivadas em meio Schneider's, foram incubadas a  $26^\circ C$  durante 24h na presença de diferentes concentrações do extrato bruto de PVA, e a  $IC_{50PRO/96h}$  foi determinada por análise de regressão linear. Para os ensaios com amastigotas, os macrófagos peritoneais de BALB/c adquiridos foram mantidos em meio RPMI 1640 completo durante 24h para adesão em lamínulas de vidro de 13mm. Os macrófagos foram infectados na proporção macrófago: leishmania, de 1:15, (5h,  $37^\circ C$ , 5%  $CO_2$ ), seguido da adição do composto (200-12,5  $\mu g/mL$ , 24h). O Glucantime<sup>®</sup> foi testado nas concentrações de 200 a 50  $\mu g/mL$ . Após a incubação, as lamínulas foram coletadas, coradas e as amastigotas foram contadas e determinada a concentração a  $IC_{50AMA}$ .

Após 24h de incubação com o composto, macrófagos peritoneais de BALB/c foram utilizados para avaliação de  $CC_{50}$  e viabilidade celular através da técnica de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio). As absorbâncias foram medidas em 570nm. Neste ensaio foram testadas concentrações entre 1000 e 0,5  $\mu g/mL$ .

#### 4.7 Avaliação pré-clínica

##### 4.7.1 Pomada

Este ensaio teve aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto Aggeu Magalhães da Fiocruz (CPqAM – Fiocruz/PE), sob o número 26/2011. Foram inoculados  $1 \times 10^7$  parasitas de *L. amazonensis* na pata traseira esquerda dos camundongos-BALB/c e após 45 dias iniciou-se o tratamento (n=5/grupo), de forma que: grupo GE-1- infecção sem tratamento; grupo GE-S - Glucantime<sup>®</sup>; grupo GE-Ø- Glucantime<sup>®</sup> + pomade-base; grupo GE-A- Glucantime<sup>®</sup> + pomada extrato. As lesões foram mensuradas com paquímetro nos dias 1, 3, 5, 7 de tratamento e no dia da eutanásia (dia 10). Foram realizadas duas medidas, no sentido longitudinal e transversal,

onde a média foi utilizada para o cálculo do tamanho da lesão. Para determinar a carga parasitária, os fragmentos das lesões foram pesados e homogeneizados em meio Schneider's completo e realizada a diluição seriada (fator 10) em placa de 96 poços. Amostra de cada animal foi plaqueada em duplicata. As placas foram incubadas por 7 dias, a 26°C e depois analisadas em microscópio invertido, com aumento de 200 e 400x.

Após eutanásia em câmara de CO<sub>2</sub>, foram retirados fígado, baço e rins para avaliação histopatológica. Esta análise foi qualitativa, a fim de verificar as características, preservação e toxicidade dos órgãos, e realizar uma comparação entre os grupos que utilizaram as formulações propostas em associação com o tratamento convencional. Os órgãos, previamente fixados em formalina, foram processados histologicamente, onde as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool etílico, diafanizadas em xilol, impregnadas em estufa sob temperatura de 62°C e incluídas em parafina. Posteriormente, cortes de 5 µm foram obtidos em micrótomo utilizando uma navalha de aço. Os cortes foram processados para análise histológica, utilizando uma solução de hematoxilina/eosina (HE). Os espécimes foram estudados utilizando microscópio óptico (OLYMPUS U-DO3).

#### 4.7.2 Extrato hidroalcoólico

Este ensaio teve aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o número 47/2013, pelo do Instituto Aggeu Magalhães da Fiocruz (CPqAM – Fiocruz/PE) e será realizado conforme descrito acima.

#### 4.8. Análise estatística

As variáveis categóricas da amostra foram expressas pela frequência relativa e as variáveis numéricas, pela média e desvio padrão. A comparação entre os resultados serão realizadas pelo teste de Wilcoxon, sendo o nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ). Para os cálculos das variáveis acima citadas, utilizamos os programas Excel versão Windows<sup>®</sup> XP (Microsoft Inc., USA) e *software* Estatística versão 8.



## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Obtenção e padronização do extrato bruto de própolis vermelha de Alagoas

Após maceração da própolis vermelha de Alagoas e concentração em rotaevaporador, obteve-se o extrato bruto, caracterizado por seu aspecto viscoso, sabor picante acentuado, forte odor e coloração vermelho vivo marcante.

### 5.2 Caracterização do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha de Alagoas

O extrato hidroalcoólico de PVA desenvolvido foi comparado com os critérios preconizados pelo MAPA, como demonstrado no quadro abaixo.

**Quadro 3 – Requisitos mínimos para extrato de própolis de acordo com o MAPA versus parâmetros encontrados no extrato hidroalcoólico de PVA**

<b>Parâmetros</b>	<b>Extrato de própolis - Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001/ Anexo VII</b>	<b>Extrato hidroalcoólico de PVA</b>
Aroma	Característico, dependendo da origem botânica (balsâmico e resinoso)	Resinoso e balsâmico
Cor	Variada, dependendo da origem e da concentração (tons de âmbar, avermelhada e esverdeada)	Avermelhada
Sabor	Característico, de suave a forte, amargo e picante	Picante
Aspecto	Líquido, límpido e homogêneo.	Líquido, límpido e homogêneo

Extrato seco	Mínimo de 11% (m/v)	15,64% (m/v)
Ceras	1% (m/m)	1% (m/m)
Compostos fenólicos	Mínimo de 0,50% (m/m)	2,83% (m/v)
Compostos flavonoides	Mínimo de 0,25% (m/m)	8,89% (m/v)
Espectro de absorção UV vis	Picos característicos de flavonoides	Picos característicos de flavonoides entre 200-400nm
Atividade de oxidação	Máximo de 22 seg	-
Teor alcóolico	Máximo de 70°GL (v/v)	42°GL (v/v)
Acetato de chumbo	Positivo	Positivo
Hidróxido de sódio	Positivo	Positivo
Pesquisa de esporos	Ausência	Ausência

**Fonte: A autora**

### 5.2.1 Avaliação das características sensoriais, características físico-químicas e pesquisa de contaminantes

A solução de extrato de própolis para uso oral apresentou aroma resinoso e balsâmico; aspecto líquido, límpido e homogêneo; cor avermelhada e sabor picante. O extrato hidroalcoólico de PVA apresentou-se dentro dos padrões exigidos pelo MAPA no que se refere aos aspectos que caracterizam os extratos de própolis de forma sensorial, não sendo encontrada discordância quanto às características descritas na legislação vigente para esta análise.

O extrato apresentou a média de 15,64% de teor de resíduo seco. Esta análise é uma das mais importantes para garantir a qualidade do extrato, pois mostra a quantidade de própolis *in natura* que está presente no produto. Longhini et al. (2007) avaliou extratos de própolis coletada em Maringá, no Paraná que apresentaram teor de resíduo seco de 14,90% que se assemelha ao valor encontrado neste estudo e que encontra-se dentro do valor imposto pelo MAPA.

Com relação ao teor de ceras, o extrato hidroalcoólico de PVA apresentou um valor de 0,01 g que é equivalente a 1%. Massuda (2003) avaliou extrato aquoso de própolis e encontrou valores

de cera que variaram de 0,0 a 0,09% e para extrato alcoólico valores entre 0,72 a 2,19%, mostrando que os extratos aquosos apresentam menor porcentagem de cera. Já Kawakita (2015) encontrou valores entre 0,96 a 1,02% em extratos alcoólicos de própolis oriundas de abelhas africanizadas, que está de acordo com este estudo e dentro do valor do MAPA.

No que diz respeito a teor de compostos flavonoides e fenólicos, o extrato apresentou valor superior ao mínimo preconizado pelo MAPA estando adequada de acordo com a legislação vigente. A tabela 1 apresenta os resultados dos ensaios espectrofotométricos realizados com o extrato de própolis para determinação de seus teores de flavonoides e fenóis totais.

**Tabela 1 – Teor de compostos fenólicos e flavonoides presentes no extrato etanólico de própolis vermelha de Alagoas**

<b>Amostra</b>	<b>Teor de flavonoides (%)</b>	<b>Teor de fenólicos (%)</b>
Extrato de PVA	8,89±0,41	2,83±0,11

**Fonte: A autora**

Chang et al. (2002) investigaram a concentração de flavonoides de 12 amostras comerciais de própolis, onde 9 eram do Brasil, 12 da Inglaterra e 1 da Nova Zelândia. As concentrações de flavonoides destes produtos variaram de 0,55% a 1,82% (m/m). Já Ássimos (2014) investigou a quantidade de flavonoides em extratos comerciais de própolis, onde a concentração máxima obtida foi de 1,74% (m/m) e a mínima foi de 0,06% (m/m). Entre todas as amostras analisadas, houve um percentual de 27% de extratos irregulares quando comparados com o valor preconizado pelo MAPA.

Longhini et al. (2007) avaliaram a otimização do processo de extração de própolis coletada em Maringá no Paraná através de parâmetros físico-químicos. Essa própolis foi extraída em etanol e propilenoglicol em diferentes concentrações e o teor de flavonoides variou de 0,08% referente a extrato glicólico a 1,81% referente a extrato etanólico. Oliveira et al. (2012) analisaram 3 marcas de extratos de própolis e verificaram que o teor de flavonoides variou de 0,81% a 1,72%, enquanto para fenólicos apresentou valores entre 3,36% e 4,81%.

Funari e Ferro (2006) encontraram valor referente a 7,39% de compostos fenólicos em uma amostra de própolis verde coletada no Estado de São Paulo, utilizando o mesmo método espectrofotométrico que foi aplicado neste trabalho. Da Silva et al. (2006) encontraram teores de fenóis entre 2,93 e 8,13%, em amostras de própolis da Paraíba, colhidas em diferentes épocas do

ano, ratificando que os compostos bioativos da própolis podem variar dependendo do período de colheita.

Apesar dos resultados serem distintos, pode-se perceber que tanto o tipo de própolis como a época da colheita, quando há variação climática e ainda a colméia, podem influenciar na proporção dos componentes (SOARES et al., 2017). Os extratos que apresentam altos teores de flavonoides e fenólicos aparecem como um indicativo de que são excelentes amostras, pois são os compostos bioativos responsáveis pelas atividades biológicas da própolis (IKEGAKI, 2001; DA SILVA et al., 2006).

O ensaio para determinar atividade de oxidação indica o potencial redutor da própolis, isto é, qual o tempo necessário que a amostra precisa para ser capaz de realizar atividade antioxidante. Neste estudo, não houve desaparecimento da cor vermelha, e conseqüentemente não foi contabilizado para avaliar o tempo de oxidação. Oliveira et al. (2012) analisaram 3 marcas de extrato de própolis comercializadas em Barra do Garças, em Mato Grosso. A amostra A apresentou tempo de oxidação de 31 segundos, a amostra B 26 segundos e a amostra C de 33 segundos, ultrapassando o valor exigido pelo MAPA, que é de 22 segundos.

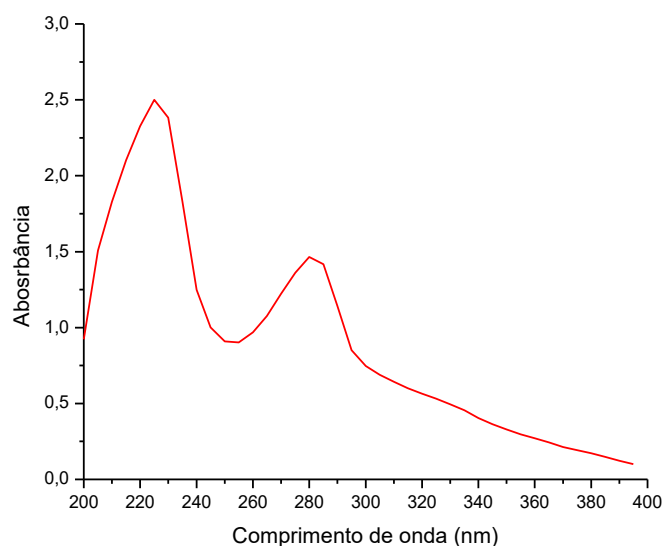
Da Silva et al. (2006) encontraram valores de atividade de oxidação que variaram de 14 segundos até 29 segundos. Este último valor que ultrapassou o exigido pelo MAPA, foi justificado pela época da colheita da própolis, onde os autores sugeriram que este seria um fator determinante para interferir nessa característica físico-química do extrato de própolis.

Segundo Pratt & Birac (1979), a atividade antioxidante dos extratos etanólico e aquoso de própolis são conferidos aos flavonoides, porém a própolis vermelha de Alagoas possui um diferencial das outras própolis no que diz respeito a composição química, especialmente a classe de flavonoides, além disso, esse método não é específico para extrato de própolis vermelha. Outras metodologias foram pesquisadas, porém, esta foi a única encontrada para tal análise, não sendo encontrado na literatura esse teste com extrato de própolis vermelha.

O extrato apresentou teor alcóolico de 42°GL. O valor máximo de acordo com o MAPA é de 70°GL (v/v).

O MAPA estabelece que o espectro de absorção de radiações no UV-Vis deve apresentar bandas características das principais classes de flavonoides entre 200 e 400 nm, o que corrobora com este trabalho (Figura 13). A presença do cromóforo do benzeno possibilita que os flavonoides e ácidos fenólicos presentes na própolis apresentem absorção na região do UV-Vis (CHANG, 2005).

**Figura 12 – Espectro de absorção com bandas características das principais classes de flavonoides em extrato de PVA**



**Fonte: A autora**

O espectro ultravioleta do extrato de própolis fundamenta-se em duas bandas de absorção nas faixas de 280-500 nm e entre 190-240 nm. Park et al. (1998) analisaram extratos etanólicos de própolis coletadas por abelhas *Apis mellifera* em diferentes concentrações de etanol quanto ao seu espectro de absorção por espectrofotometria na região ultravioleta. Os espectros de absorção desses extratos exibiram uma máxima absorção a 290 nm, assim como mostrado neste estudo.

Com relação a solubilidade em acetato de chumbo e hidróxido de sódio, a formação de precipitado branco e amarelo homogêneo no fundo do tubo de ensaio confirmaram esta solubilidade, respectivamente. Kawakita et al. (2015) analisaram informações sobre a vida útil do extrato hidroalcoólico de própolis coletada em Botucatu, no estado de São Paulo e produzida em colméias de abelhas africanizadas. Essas análises foram realizadas de acordo com a legislação em vigor. O extrato da própolis foi preparado e analisado em 12 períodos de tempo diferentes, variando de 0 até 330 dias. Mesmo assim, todas as amostras apresentaram-se como positivas em se tratando de solubilidade em acetato de chumbo e em hidróxido de sódio, indicando que mesmo sob influência do tempo, não houve alteração.

Tagliacollo & Orsi (2011) também analisaram esse parâmetro físico-químico em extratos de própolis coletadas no estado de São Paulo. Em relação à solubilidade em acetato de chumbo, 97,5% dos extratos tiveram resultados positivos, e nenhuma amostra apresentou-se negativa para solubilidade em hidróxido de sódio.

Para a pesquisa de contaminantes, após coloração de Gram, não foi observada presença de bactérias nas lâminas. Também não foi observado crescimento de colônias nas placas com meio ágar chocolate (Figura 18). Dessa forma, o extrato de PVA confirmou sua atividade antimicrobiana já descrita na literatura. Dausch et al. (2008) afirmaram que a própolis vermelha possui atividade antimicrobiana, embora apresente uma menor atividade quando as abelhas recolhem resinas de diferentes plantas para produzir própolis.

De acordo com Regueira Neto et al. (2017) a utilização de própolis vermelha brasileira coletada nos períodos mais secos na cidade de Tamandaré, em Pernambuco, pode ser usada como adjuvante contra infecções bacterianas multirresistentes. A própolis vermelha mostrou valores de concentração inibitória mínima (CIM) de 512 µg/mL contra ambas as cepas de *P. aeruginosa* usadas no estudo e contra estirpes de bactérias Gram positivas *S. aureus* as CIMs variaram de 64 µg/mL a  $\geq 1024$  µg/mL. Segundo Trusheva et al. (2006) a atividade antibacteriana que pode ser encontrada na própolis vermelha brasileira é atribuída aos flavonóides, principalmente aos isoflavonoides e benzofenonas preniladas.

**Figura 13 – Placas com meio ágar chocolate com ausência de crescimento de colônias de bactérias**



**Fonte: A autora**

### **5.3 Avaliação da atividade antioxidante**

Após análise em espectrofotômetro, as absorbâncias encontradas tanto do controle como na amostra, foram substituídas na equação descrita anteriormente. A atividade de sequestro de radical livre DPPH da nossa formulação está apresentada na tabela 2.

**Tabela 2 – Atividade antioxidante do extrato de própolis vermelha de Alagoas**

Amostra	Sequestro do radical livre DPPH (%SRL)
Extrato de PVA	69,7±1,27

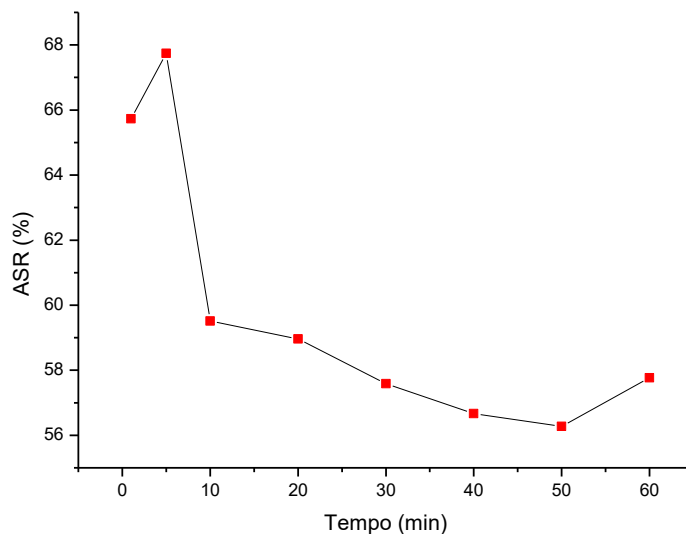
**Fonte: A autora**

Andrade et al. (2017) investigaram a atividade antioxidante das própolis do tipo marrom, verde e vermelha da região Nordeste, através do teste de DPPH. A porcentagem de inibição variou de 86 a 90,7%. A própolis vermelha exibiu o maior valor de inibição (90,72%) do radical DPPH, seguida da própolis verde (88,53%) e por último a marrom (86,06%). Nesse caso a propolis vermelha apresentou maior poder de sequestro de radical livre DPPH, isso pode ser justificado pelo fato de que, de uma colmeia para outra há diferenças significativas com relação aos seus constituintes químicos que levam as suas atividades biológicas (OLIVEIRA et al., 2012). Além disso, Ikegaki (2010) também demonstrou que abelhas que habitam em um mesmo apiário produziram propolis de constituição química diferentes.

Xavier et al. (2017) analisaram própolis de dois municípios do estado da Bahia, Tucano e Ribeira do Pombal, sendo denominados de amostras A e B respectivamente. O extrato etanólico de própolis A, apresentou 44,7% de capacidade de sequestrar radical, seguido do extrato B que apresentou um valor de 14,8%. Segundo Kamiya et al. (2012) e Olczyk et al. (2016), a capacidade de eliminação de radicais livres das formulações de própolis também parece estar associada à presença de compostos fenólicos, com destaque para os flavonoides, como por exemplo, apigenina, crisina, galangina, pinocembrina, 5-hidroxi-40,7-dimetoxiflavona, quercetina, daidzeína, dentre outros. Essa atividade antioxidante confirmada em diversos estudos pode ainda prevenir o dano oxidativo do DNA gerado por espécies reativas de oxigênio (MOURÃO, 2013). Pode-se dizer que neste trabalho, o extrato de PVA apresentou uma porcentagem de atividade antioxidante satisfatória confirmando mais uma vez essa atividade biológica do 13º tipo de própolis e que pode ser atribuída aos flavonoides.

Em relação à cinética, o extrato de PVA apresentou percentual de redução em torno de 65% no primeiro minuto, e esse percentual aumenta para cerca de 67% nos primeiros 5 minutos. A seguir, esse valor diminui para cerca de 57% e em 30 minutos, aproxima-se de 58%, assim como em 60 minutos. Em experimentos realizados por Park et al. (2017) a capacidade de captura do DPPH por diversos tipos de própolis permaneceu de uma forma mais lenta, durante as 3 horas de observação. Neste estudo, o tempo foi de 1 hora, não sendo observado esse desempenho.

**Figura 14 – Cinética da atividade sequestradora do radical livre DPPH (ASR)**



**Fonte: A autora**

#### **5.4 Avaliação da estabilidade e caracterização da formulação semissólida**

No teste de estabilidade preliminar, a pomada não demonstrou separação de fases na pós-centrifugação, mantendo sua aparência ao longo dos 8 meses. As características organolépticas, pH e viscosidade decorrentes do teste de estabilidade em prateleira estão compilados na.

A formulação com própolis apresentou odor e cor característicos desta classe de própolis. Com relação ao pH, sabe-se que a pele apresenta pH levemente ácido (4,6 – 5,8), que contribui para que ocorra proteção bactericida e fungicida em sua superfície (LEONARDI; GASPAR; CAMPOS, 2002). Inicialmente (72 horas), os valores de pH encontrados nas formulações variaram entre 6,09 (pomada-base) e 6,62 (extrato). Tais resultados demonstraram que a variação de pH foi pequena e não indica possibilidade de irritação, levando-se em consideração que segundo Aulton (2005), o estrato córneo da pele é consideravelmente resistente a alterações de pH, tolerando uma variação de 3 a 9. Com relação ao pH, a pomada-base começou com 6,09 e após 8 meses, foi observado esse mesmo valor, porém ao decorrer desse tempo, o pH oscilou. E a pomada com extrato apresentou a mesma característica com valor inicial de 6,62 e final de 6,62. De acordo com tais resultados, num período de 8 meses, os valores de pH sofreram variações aleatórias, no entanto, não ultrapassaram os limites suportados pela pele com valor mínimo de 5,09 e máximo de 6,88. O pH é um dos fatores que pode modificar a estabilidade de uma pomada, já que ele indica pontos onde ocorre ou não a formação precoce de processos de oxidação e hidrólise do material oleoso (ATKINS, 1999). Não



foram observadas mudanças referentes ao aspecto e cor das pomadas durante os 8 meses de avaliação.

Lucena et al. (2009) avaliaram a estabilidade da pomada à base de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Conville e observaram que a incorporação do extrato seco fez o pH sofrer alteração, onde o valor aumentou de 6,00 para 7,00 no primeiro mês, porém, a partir do segundo mês já não houve nenhuma alteração. Mesmo assim, essa alteração não afetou a estabilidade da formulação após 3 meses. Os aspectos referentes a cor, odor e aspecto não sofreram alterações nesses 3 meses, assim como neste trabalho.

Dantas, Dos Santos e Zocoler (2014) analisaram a estabilidade de uma pomada contendo extrato glicólico de *Spondias dulcis*. As formulações foram avaliadas nos tempos 0, 7, 14, 21 e 28 dias. Em condições ambientais, as amostras da pomada não sofreram modificações no que diz respeito à aparência, cor, odor e brilho; o pH das pomadas armazenadas em temperatura ambiente variou entre 3,45 e 4,91. Esses valores demonstram que a pomada manteve-se em pH ácido aceitável para veiculação de extratos contendo taninos e flavonoides. Assim como em nossas formulações, as pomadas mantiveram o pH ácido, desde a sua fabricação, até os 8 meses de avaliação. Não foram encontrados estudos na literatura que avaliassem a estabilidade de pomada contendo extrato de própolis.

Quanto à viscosidade, os valores encontrados foram semelhantes entre as formulações, tendo um leve aumento da viscosidade quando comparados base (6,23 mm<sup>2</sup>/s) e extrato (6,32 mm<sup>2</sup>/s) nas primeiras 72h. Aos 8 meses de avaliação, a pomada base apresentou 6,50 mm<sup>2</sup>/s e a pomada com extrato 5,88 mm<sup>2</sup>/s, tendo uma leve alteração.

### **5.5 Avaliação da atividade leishmanicida e citotoxicidade in vitro**

Os valores de IC<sub>50</sub> (µg/mL) encontrados para *L. amazonensis* em formas amastigotas e promastigotas e valores de CC<sub>50</sub>(µg/mL) são apresentados na tabela 3.

**Tabela 3 – Avaliação da atividade leishmanicida e citotoxicidade**

Compostos-teste	IC <sub>50</sub> AMA (µg/mL)	IC <sub>50</sub> PRO (µg/mL)	CC <sub>50</sub> (µg/mL)
Glucantime®	Não determinada	1126	353,4
Extrato de PVA	17,60	32,40	127,3

**Fonte: A autora**

O extrato apresentou atividade leishmanicida, tendo sido obtido valor de IC<sub>50</sub>AMA de 17,60 µg/mL e 32,40 µg/mL para IC<sub>50</sub>PRO. O Glucantime® (controle positivo) não teve sua IC<sub>50</sub>AMA determinada em função da sua elevada citotoxicidade.

Ayres, Marcucci e Giorgio (2007) avaliaram diversas própolis brasileiras sobre promastigotas, amastigotas e macrófagos peritoneais infectados por *L. amazonensis*. Os extratos etanólicos de todas as amostras apresentaram atividade leishmanicida, mas a PVA se destacou, o que corrobora com os nossos resultados. Ela foi a mais ativa contra esta espécie, além de não ter se mostrado tóxica sobre macrófagos. Como o extrato não apresentou efeito direto sobre os parasitas, a atividade leishmanicida observada foi atribuída à ativação macrofágica, culminando na morte dos parasitas.

Machado et al. (2007) investigaram extratos de amostras de própolis coletadas em Minas Gerais, no Brasil, contra espécies nas formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis* do Novo Mundo em comparação com própolis da Bulgária. O extrato de própolis brasileira apresentou valor de IC<sub>50</sub>PRO de 229,3 mg/mL para *L. amazonensis* e de 48,6 mg/mL para espécies *L. braziliensis*. Quando comparado com este estudo, pôde-se observar que o valor de IC<sub>50</sub>PRO é menor, demonstrando que sua atividade leishmanicida é melhor frente a forma infectante de *L. amazonensis*.

Pontin et al. (2008) investigaram a ação leishmanicida do extrato hidroalcoólico de própolis verde, in vitro, sobre parasitas (promastigotas e amastigotas), onde este extrato mostrou atividade contra promastigotas, embora tenha sido inativo contra amastigotas. Este resultado difere do que ocorreu em nosso estudo, pois o extrato de PVA apresentou atividade leishmanicida contra as duas formas.

Ozbilge et al. (2010) analisaram extrato etanólico de própolis coletada de Kayseri, na Turquia, e testaram contra formas promastigotas de *L. tropica*. Pôde ser observado que o extrato foi eficaz

contra as formas promastigotas, sendo capaz de inibir os parasitas começando com a concentração de 32 µg/mL, provando que seu efeito foi dependente do tempo e da concentração de própolis.

Cuesta-Rubio et al. (2017) avaliaram três amostras de própolis coletadas no Equador, e obtiveram extratos metanólicos através de maceração. Todos os três extratos foram capazes de inibir o crescimento de *L. amazonensis*, com valores de IC<sub>50</sub> que variaram de 27,5 µg/mL até 141,7 µg/mL para formas promastigotas e valor de 17,9 µg/mL para formas amastigotas, valores estes que estão em concordância com este estudo. Os autores afirmaram ainda que a própolis mais rica em flavonoides foi a mais ativa.

Neste trabalho, o extrato apresentou valor de CC<sub>50</sub> superior aos valores de IC<sub>50</sub>. Pontin et al. (2008) avaliaram atividade leishmanicida in vitro do extrato hidroalcoólico de própolis verde brasileira contra formas promastigotas e amastigotas de *L. V. braziliensis*. No teste de citotoxicidade in vitro, a própolis não apresentou citotoxicidade nas doses máximas testadas. Cuesta-Rubio et al. (2017) também investigaram a concentração do extrato de própolis que causaria 50% de mortalidade em marófagos peritoneais de BALB/c, onde a amostra mais rica em flavonoides apresentou um CC<sub>50</sub> sete vezes superior ao valor de IC<sub>50</sub>.

## 5.6 Avaliação pré-clínica

### 5.6.1 Pomada

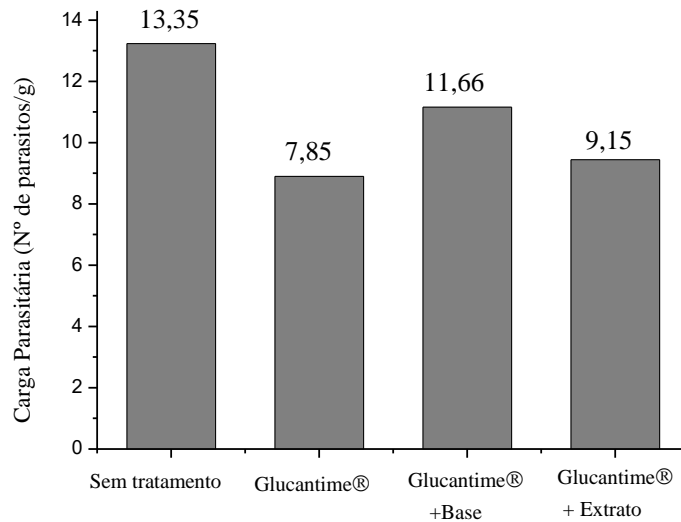
No que diz respeito a carga parasitária, o grupo que utilizou apenas o Glucantime® teve uma maior redução. O grupo GE-S, reduziu a carga parasitária e, embora a base (grupo PC-Ø) tenha implicado em um efeito negativo nessa redução, o grupo GE-1 não apresentou diferença significativa quando comparado a GE-S. Houve diferença significativa ( $p=0,0009$ ) entre o grupo GE-1, e os demais grupos. A figura 17b apresenta a quantificação da carga parasitária.

Com relação ao tamanho das lesões, o grupo GE-1, sem tratamento apresentou um tamanho maior em relação aos demais grupos. O grupo que utilizou apenas o tratamento convencional mostrou tamanho de lesões bem semelhantes ao grupo que utilizou esquema de terapia combinada com a pomada contendo o extrato. Já o grupo que utilizou pomada base apresentou uma diminuição no tamanho das lesões no 5º dia de tratamento, e depois disso houve um aumento que seguiu até o dia da eutanásia. Comparando-se a média dos grupos de todo o tratamento, houve diferença

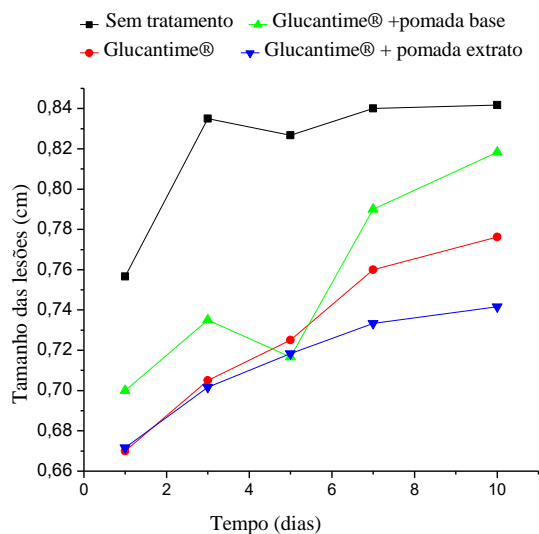
significativa ( $p < 0,0001$ ) entre o grupo GE-1 e os demais. A figura 17a representa o acompanhamento dos tratamentos em função do tamanho das lesões com o tempo.

**Figura 15 – Avaliação in vivo na etapa pré-clínica. (A) carga parasitária; (B) tamanho das lesões**

(A)



(B)



**Fonte: A autora**

Pontin et al. (2008) investigaram a ação leishmanicida do extrato hidroalcoólico de própolis verde, in vivo, em camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis*. Os camundongos foram tratados (1,5mg/kg/dia) com: extrato, via oral; extrato, via tópica; extrato, vias oral e tópica; Glucantime®; NaCl 0,9% (controle negativo). Os três primeiros grupos levaram a uma redução do diâmetro das lesões, após 90 dias, em 78,6%, 84,3% e 90,0%, respectivamente, enquanto que o

Glucantime<sup>®</sup> apresentou 57,7% de redução, todos em comparação ao controle negativo. Comparando com este trabalho, pode-se perceber que o Glucantime apresentou efeito sobre tamanho de lesões muito semelhante com os dois tipos de pomada, diferindo apenas do grupo que não fez tratamento.

Ayres et al. (2011) investigaram o efeito do gel de própolis vermelha brasileira sozinho ou combinado com Glucantime<sup>®</sup> na infecção por *L. amazonensis*. O tratamento dos camundongos foi realizado utilizando própolis vermelha coletada no estado de Alagoas e Glucantime, e o gel sem própolis foi utilizado como controle. As aplicações epicutâneas nas lesões foram realizadas duas ou três vezes por dia durante 20 dias após inoculação de *L. amazonensis*. O Glucantime foi injetado por via intraperitoneal uma vez por dia durante 20 dias após a inoculação da espécie de *Leishmania spp.* O gel de própolis sozinho não foi eficiente contra lesões de LT, porém essas lesões mostraram um aspecto menos exsudativo em animais tratados com propaína sozinhos ou combinados com Glucantime. Apesar de não haver avaliação da pomada com extrato sozinha para tratamento de LT neste trabalho, não houve diferença significativa entre a pomada contendo extrato e os demais grupos.

Rebouças-Silva et al. (2017) analisaram diferentes extratos de própolis (etanólico, glicólico e extrato seco) contra formas promastigotas e amastigotas de *L. (V) braziliensis* in vitro. Todos os extratos reduziram a carga parasitária de forma dose-dependente. Além disso, o tratamento com extratos alcoólicos e glicólicos mostrou-se mais eficaz na redução do número de parasitas do que com extrato seco, e isso pode ser justificado devido às composições químicas distintas desses extratos. Neste trabalho, houve redução de carga parasitária quando utilizado a pomada com extrato de PVA, porém o uso do Glucantime foi superior, reduzindo a carga de forma mais expressiva.

### 5.6.2 Avaliação histopatológica

A análise histológica foi realizada com baço, rins e fígado. Na análise morfológica do baço obtido dos animais do grupo sem infecção, grupo G1, foi observado que o órgão apresenta uma cápsula própria, de tecido conjuntivo fibroso, da qual se estendem trabéculas para dentro do parênquima. Esse tecido conjuntivo trabecular carrega vasos sanguíneos que permeiam as estruturas esplênicas. Foram evidenciados os dois compartimentos que formam o parênquima esplênico: a polpa branca, constituída por um conjunto de bainhas linfoides periarteriais e por nódulos linfoides;

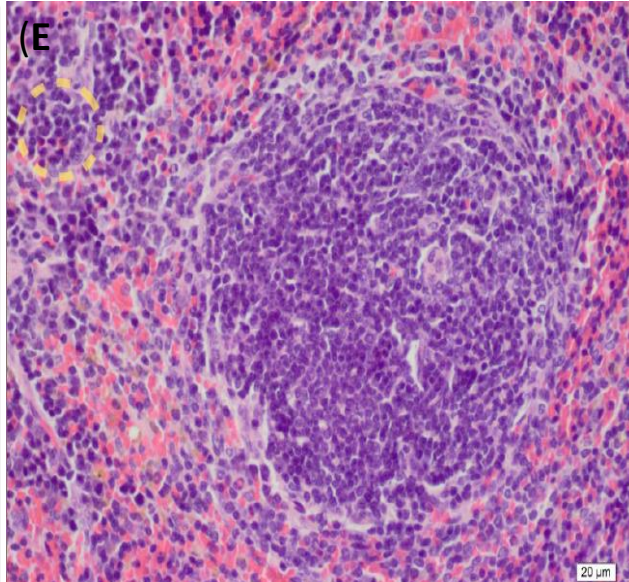
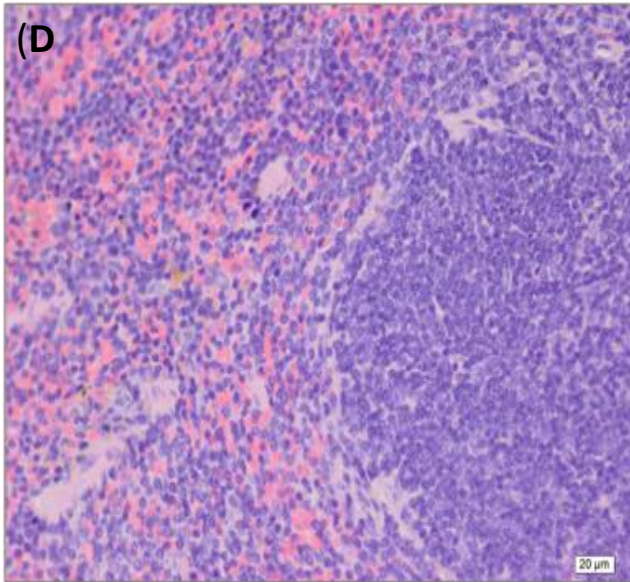
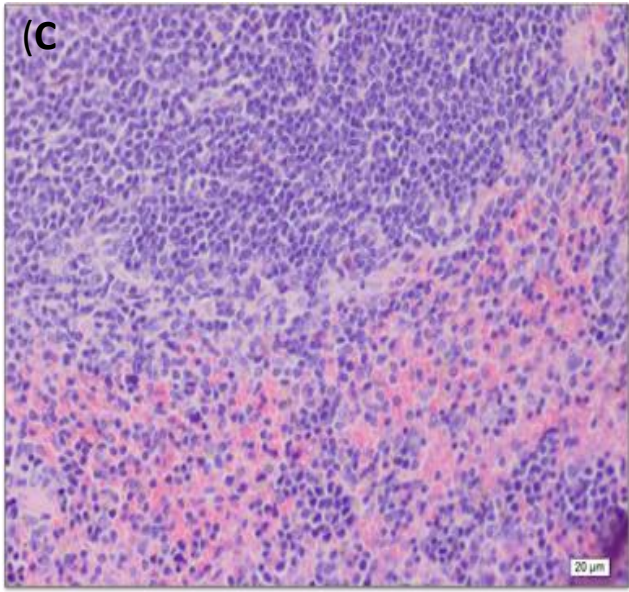
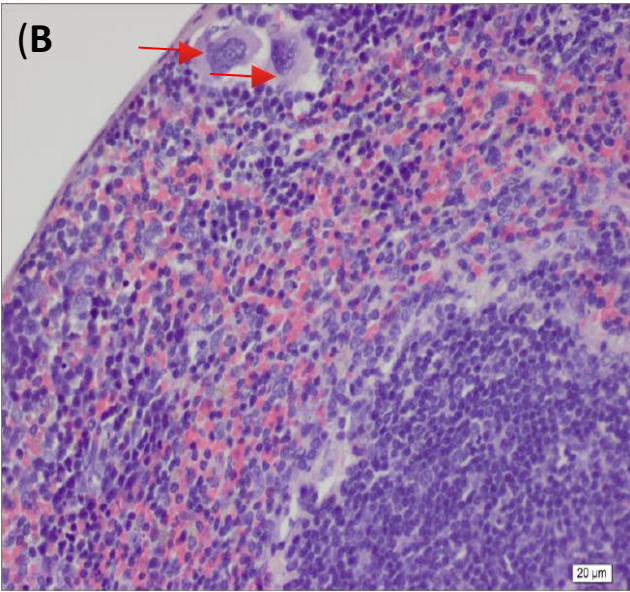
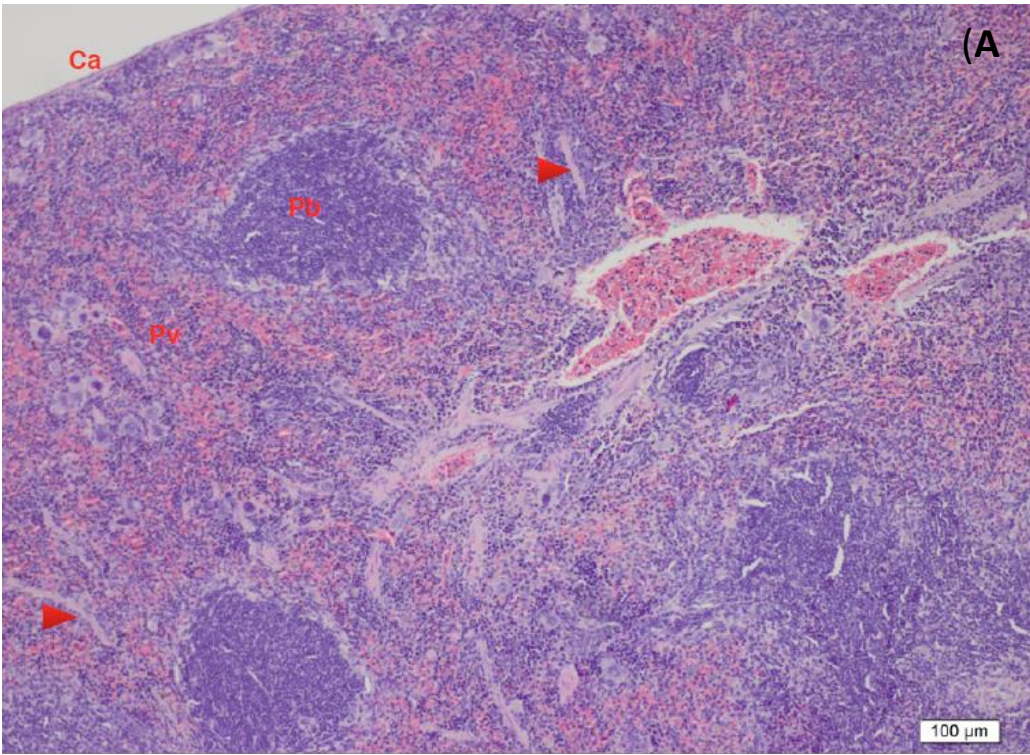
e a polpa vermelha, que perfaz a maior parte do órgão, é um tecido altamente vascularizado que envolve, sem limites distintos, a polpa branca (figura 19A).

O grupo de animais infectados sem tratamento, grupo G2, evidenciou que a estrutura capsular se manteve delgada e o parênquima com a organização de polpa branca e polpa vermelha. Entretanto, foi observado no parênquima o surgimento de células hipertróficas localizadas, majoritariamente, na região subcapsular. O infiltrado linfocitário foi bem caracterizado neste grupo (figura 19B).

Quando avaliados os grupos de animais infectados tratados com Glucantime® ou Glucantime® + pomada base, grupos G3 e G4, respectivamente, foram notadas semelhanças nos aspectos morfológicos do órgão (figuras 19C e 19D). A região de polpa branca apresentou-se constituída, predominantemente, por linfócitos, com algumas figuras de macrófagos, os quais também estavam presentes na polpa vermelha. Além disso, na polpa vermelha foi observado um aumento de linfócitos em ambos os grupos de tratamento.

Em relação ao grupo infectado e tratado com Glucantime® + extrato, grupo G5 (figura 19E), foi possível observar um acúmulo de linfócitos na polpa vermelha, favorecendo o surgimento de pequenas “ilhas” de linfócitos. A polpa branca apresentou microarquitetura semelhante ao observado no grupo G1.

**Figura 16 – Aspectos morfológicos do baço.**



**Fonte:** A autora

**Legenda:** Fotomicrografias de corte histológicos obtidos do baço de camundongos dos grupos G1 (A), G2 (B), G3 (C), G4 (D) e G5 (E). Coloração hematoxilina e eosina. Ca = capsula; Pb = polpa branca; Pv = polpa vermelha; Cabeça de seta = trabécula; Seta = Célula hipertrófica; Área circundada = “ilhas” de linfócitos. Aumento de 10X em A; Aumento de 20X nas demais. Fotomicrografias representativas dos cortes seriados.

A análise microscópica do rim proveniente dos animais sem infecção, grupo G1, revelou a presença de uma cápsula delgada de tecido conjuntivo frouxo em sua superfície. Abaixo da cápsula notou-se a região cortical, subdividida em córtex superficial e cortex profundo. Internamente, foi observada a região medular que também apresentou duas porções: a medular interna e a medular externa. Observou-se, na região cortical, a presença de corpúsculos renais, constituídos pelo glomérulo renal e cápsula de Bowmann. Ainda nesta região, distinguiram-se os túbulos contorcidos proximais e distais, ambos se mostraram em cortes transversais e longitudinais. Na região medular, pôde ser vista uma série de túbulos e alças com epitélio de revestimento variando de cúbico aplanado (figura 20A).

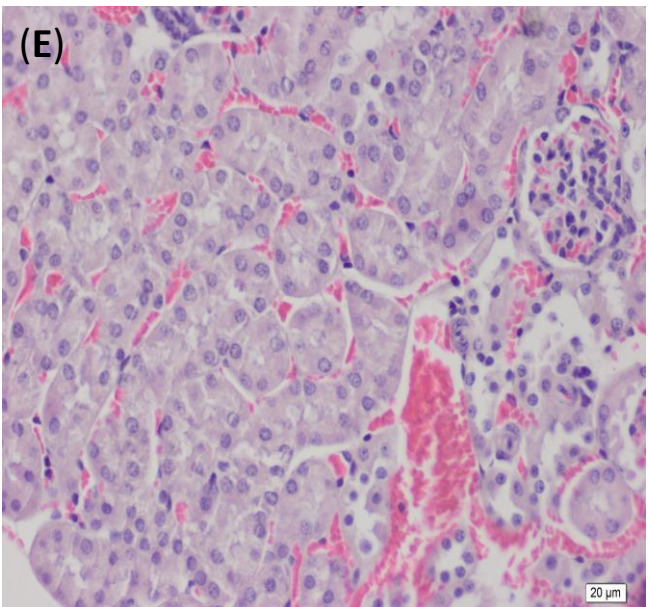
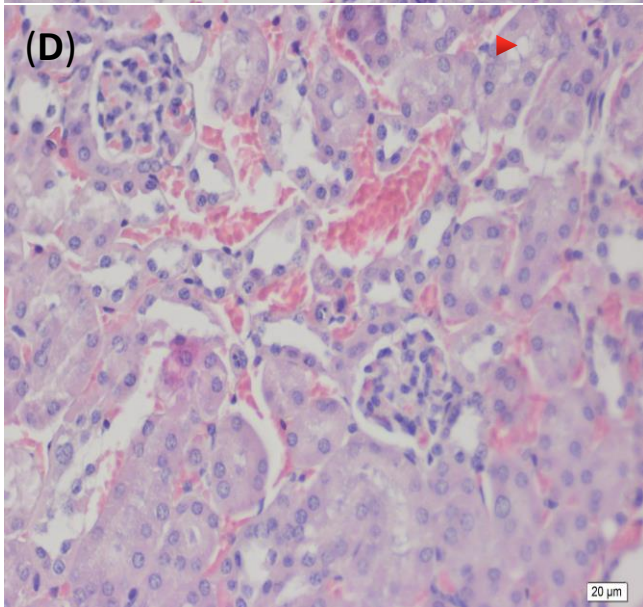
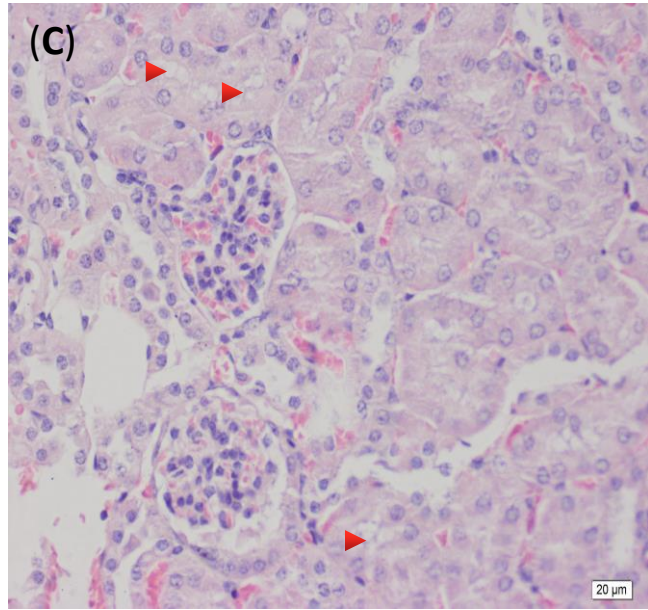
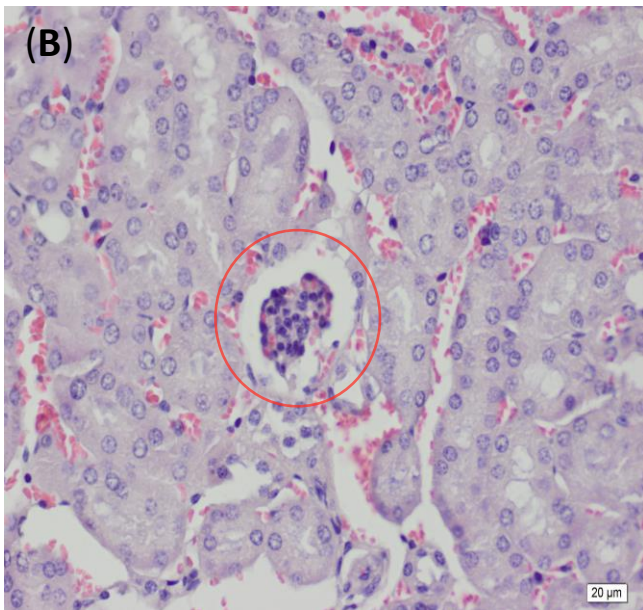
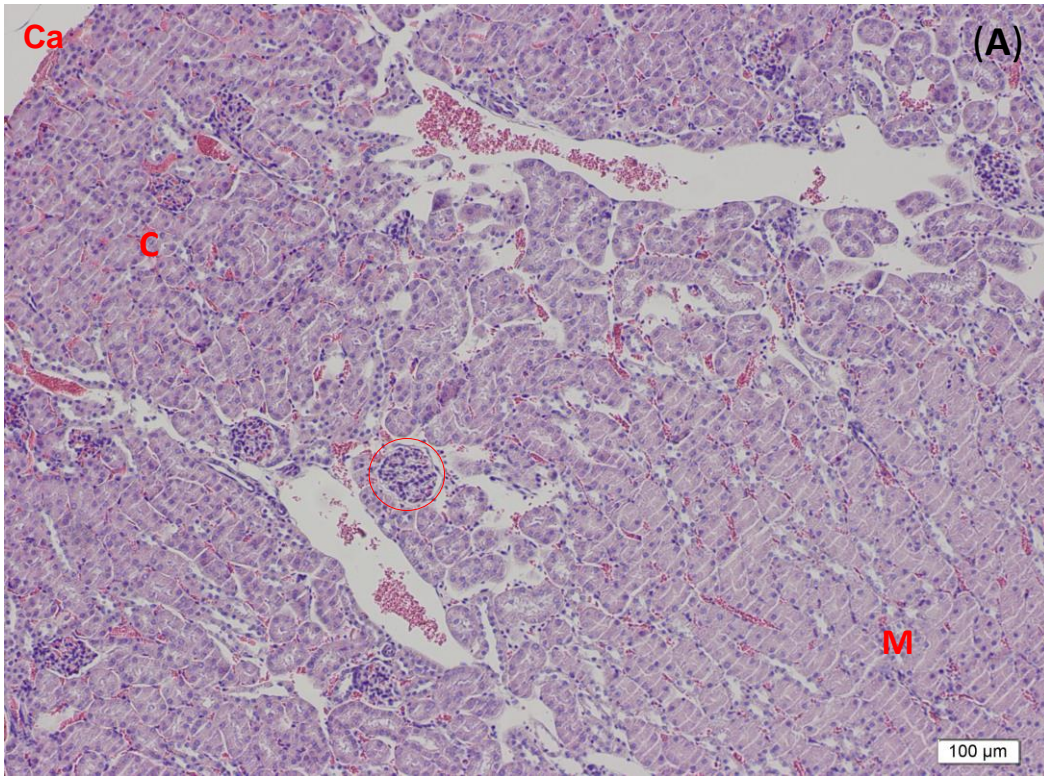
No grupo de animais infectados e sem tratamento, grupo G2, observou-se atrofia do tufo glomerular e desorganização do parênquima. Foi notada a presença de sinais de necrose tecidual, células com núcleo fracamente corado e discreto infiltrado celular (figura 20B).

A análise dos grupos Glucantime<sup>®</sup> e Glucantime<sup>®</sup>+ pomada base, grupos G3 e G4, respectivamente, revelou alterações semelhantes. Na região cortical do rim destes grupos, foi possível notar células do epitélio tubular apresentando estruturas semelhantes a vacúolo, podendo ser um indicativo de morte celular. Além disso, os núcleos dessas células apresentaram-se fracamente corados, indicando pouca atividade celular. Foram observados, ainda, sinais de necrose próximos aos glomérulos renais e alterações na região medular de ambos os grupos, além de uma organização irregular do parênquima renal, com aspecto de agressão tecidual (figuras 20C e 20D).

A figura 20E ilustra o grupo de animais infectados e tratados com Glucantime<sup>®</sup>+ extrato, grupo G5, no qual as características morfológicas do parênquima do órgão encontraram-se preservadas. Os núcleos das células epiteliais tubulares estavam mais evidentes. Não foram observados sinais de necrose tecidual, mas ainda foi possível observar um discreto infiltrado celular.

**Figura 17 – Aspectos morfológicos dos rins.**





**Fonte:** A autora

**Legenda:** Fotomicrografias de corte histológicos obtidos do rim de camundongos dos grupos G1 (A), G2 (B), G3 (C), G4 (D) e G5 (E). Coloração hematoxilina e eosina. Ca =capsula; C = cortex; M = medula; Cabeça de seta = vacúolos; Área circundada = glomérulos. Aumento de 10X em A; Aumento de 20X nas demais. Fotomicrografias representativas dos cortes seriados.

do fígado de camundongos sem infecção, grupo G1 (Figura 18A), mostrou que o órgão encontra-se envolvido por uma cápsula conjuntiva e no parênquima foram observados os lóbulos hepáticos delimitados por um escasso tecido conjuntivo. Os lóbulos hepáticos são constituídos por hepatócitos que se dispõem em cordões com orientação radial em relação à veia central. O arranjo desses cordões foi regular e eles encontravam-se separados uns dos outros por capilares sinusoides.

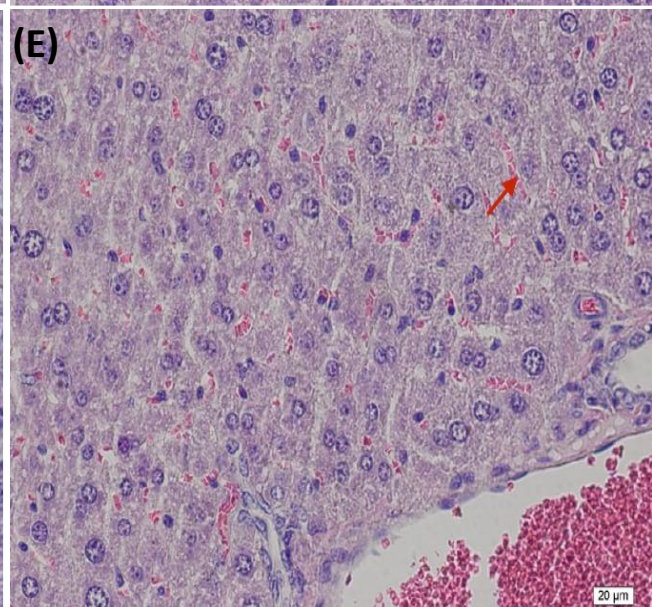
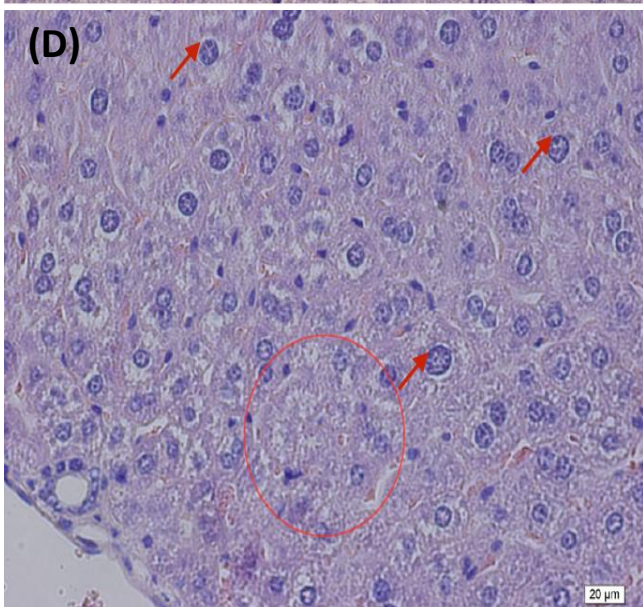
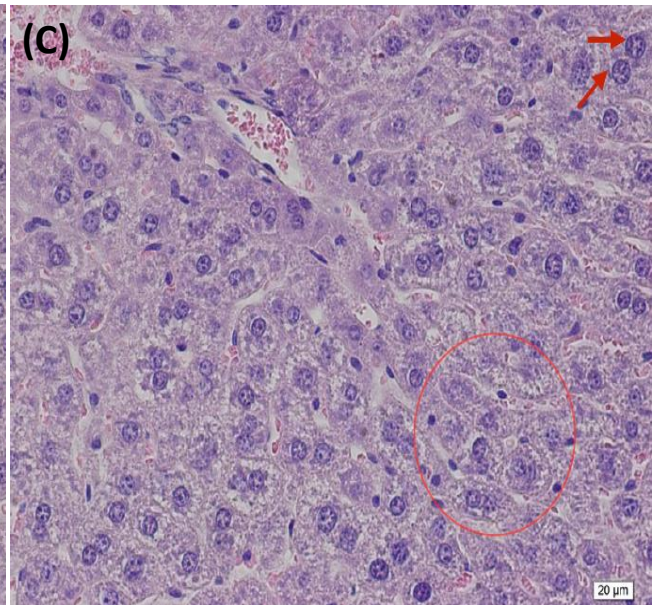
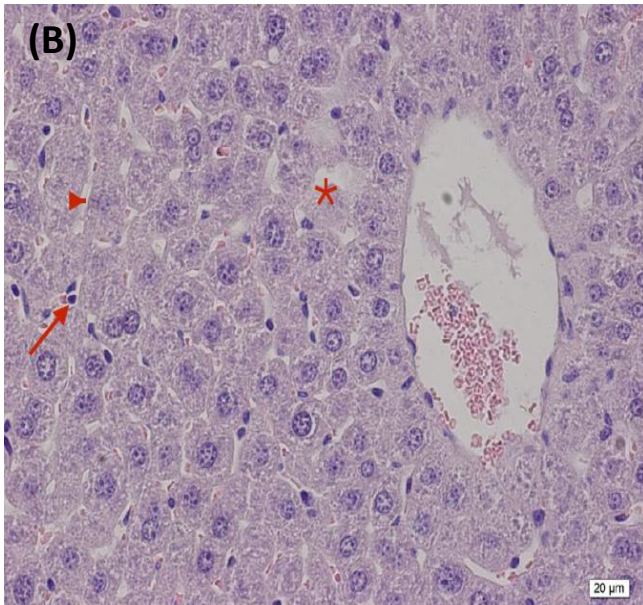
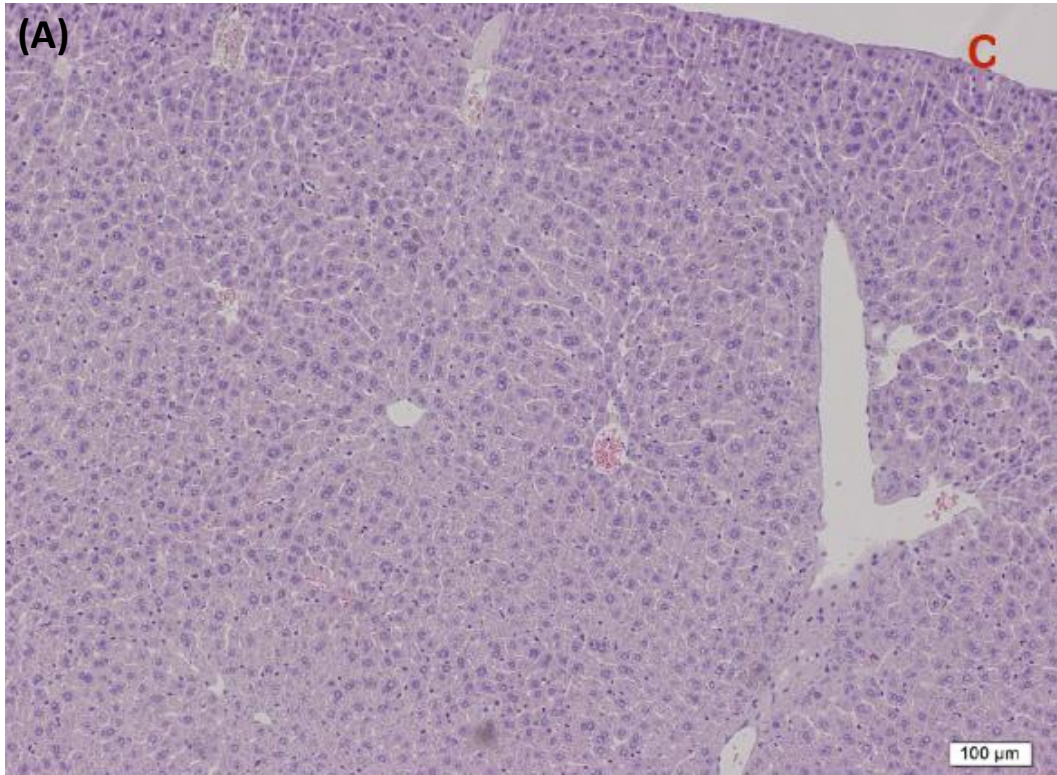
No grupo de camundongos infectados e sem tratamento, grupo G2, não foram observadas alterações na microarquitetura do lóbulo hepático. Foi possível observar alguns hepatócitos com pouca atividade metabólica ou em processo de morte celular. Linfócitos perissinusoidais foram vistos de maneira discreta na amostra (figura 18B).

No grupo de estudo em que os animais infectados foram tratados apenas com Glucantime<sup>®</sup>, grupo G3 (figura 18C), foi possível notar alterações no arranjo dos cordões hepáticos. Além disso, os hepatócitos apresentaram um aspecto mais túrgido quando comparados aos grupos G1 e G2. Também foi observada degeneração de hepatócitos, evidenciando uma massa hepática e desintegração da organização normal do parênquima hepático. Um infiltrado discreto foi visualizado nestas amostras.

Em relação ao grupo G4, Glucantime<sup>®</sup> + pomada base, foram notadas alterações morfológicas semelhantes ao grupo G3, isto é, alterações no parênquima hepático e o arranjo cordonal de hepatócitos não foram visualizados. Esse aspecto morfológico alterado pareceu influenciar na morfologia dos hepatócitos que, mais uma vez, assumiram aspecto túrgido. Áreas evidenciando massa hepática com morte celular ou com baixa atividade celular foram comuns no fígado dos animais estudados neste grupo. A micrografia está ilustrada na figura 18D.

Quando da análise do grupo de animais infectados e tratados com Glucantime<sup>®</sup> + extrato, grupo G5, os hepatócitos apresentaram aspectos típicos, semelhante ao que foi observado no grupo G1. Os capilares sinusoides foram bem visualizados, delimitando os cordões hepáticos de forma discreta (figura 18E). Assim, quando comparado aos grupos G3 e G4, o extrato pareceu ter promovido um efeito hepatoprotetor, mantendo ou protegendo a microarquitetura do órgão.

**Figura 18- Aspectos morfológicos do fígado**



**Fonte: A autora**

**Legenda: Fotomicrografias de cortes histológicos obtidos do fígado de camundongos dos grupos G1 (A), G2 (B), G3 (C), G4 (D) e G5 (E). Coloração hematoxilina e eosina. C = cápsula; cabeça de seta = capilares sinusoides (A); seta = linfócito (B); \* = hepatócito em processo de morte celular; seta = hepatócito com aspecto turgido (C e D); área circulada = massa hepática; seta = capilar sinusoide (E). Aumento de 10X em A; aumento de 20X nas demais. Fotomicrografias representativas dos cortes seriados.**

Destaca-se que Doganyigit et al. (2013) observaram redução de dano hepático do extrato aquoso de própolis verde por via intraperitoneal em quadro de endotoxemia experimental (induzida por lipopolissacarídeo, LPS) em ratos. A solução salina normal foi utilizado em ratos como grupo controle. Seis horas após a aplicação, foram avaliados os níveis bioquímicos e as alterações histopatológicas, onde os resultados demonstraram que a administração de própolis pode ter um efeito protetor contra dano tecidual. Este estudo demonstra que a própolis consegue ser capaz de exercer um efeito hepatoprotetor, assim como foi apresentado em resultados deste estudo.

Da Silva et al. (2016) avaliaram o efeito de própolis coletada em São Paulo em baixa dose sobre inflamação do fígado após infecção por *L. amazonensis*. Formas promastigotas de *L. amazonensis* ( $10^7$ ) foram inoculadas na pata traseira dos camundongos BALB/c. Depois de 15 dias, os animais foram tratados diariamente com própolis (5 mg/kg), Glucantime<sup>®</sup> (10 mg / kg), ou com própolis combinado com Glucantime<sup>®</sup>. Após 60 dias, os camundongos foram eutanasiados e os fígados foram coletados para análise de processo inflamatório. A amostra de fígado coletada para análise histológica mostrou que a infecção por *L. amazonensis* provocou alterações histológicas. Essas alterações culminaram em aumento da infiltração de células de Kupffer, granuloma intralobular, além de inflamação no tecido. Essas alterações foram reduzidas após o tratamento com própolis a 5 mg/kg. O Glucantime<sup>®</sup> também reduziu as alterações no tecido do fígado mas em um nível menor. O tratamento com própolis e Glucantime<sup>®</sup> reduziram a deposição de fibras colágenas totais quando comparadas com o grupo controle infectado. Estes resultados estão em consonância com este trabalho, sugerindo mais uma vez que o tratamento de forma combinada entre extrato de própolis e o fármaco é promissor.

Não foram encontrados estudos que demonstrassem avaliação histológica de baço e rins, nem trabalhos que apresentassem efeito protetor por via tópica de própolis vermelha para LT.

Assim, a formulação com o extrato pareceu ter promovido um efeito protetor, tanto no fígado, como baço e rins, mantendo ou protegendo a microarquitetura destes órgãos.

## 6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos até o presente momento indicam que o extrato bruto foi padronizado e o extrato hidroalcoólico de própolis desenvolvido atendeu aos requisitos mínimos do Ministério da Agricultura (exceto no que se refere à “atividade de oxidação”) e apresentou um alto teor de flavonoides e seguirá para novos ensaios.

Com relação a atividade antioxidante pelo método DPPH, o extrato hidroalcoólico apresentou atividade antioxidante satisfatória confirmando sua atividade biológica.

A formulação semissólida não sofreu alterações em suas características organolépticas, pH e viscosidade durante os 8 meses de avaliação de estabilidade.

Na etapa *in vitro*, a co-terapia revelou efeitos muito similares ao tratamento convencional realizado com Glucantime<sup>®</sup>. Na etapa *in vivo*, pré-clínica, a combinação entre Glucantime<sup>®</sup> e extrato de própolis vermelha de Alagoas na formulação de uso tópico se mostrou superior em comparação com os outros grupos, com relação ao efeito protetor sobre os órgãos, porém não mostrou atividade leishmanicida estatisticamente diferente do tratamento convencional.

Todavia, considerando a toxicidade, que é um efeito secundário grave do tratamento, e ainda, o prolongado processo de cicatrização das feridas, a pomada contendo o extrato da própolis seria uma opção de baixo custo e com via de administração tópica, o que poderia facilitar a adesão dos pacientes acometidos por esta parasitose.

## REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos**. Brasília: ANVISA, 2004.
- AKBARI, M.; ORYAN, A.; HATAM, G. Application of nanotechnology in treatment of leishmaniasis: A review. **Acta tropica**. v. 172, p. 86-90, 2017.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE**. v. 7, n. 5, p. 1-12, 2012.
- ANDRADE, J.K.S. et al. Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region. **Food Research International**. v. 101, p. 129-138, 2017.
- AOAC, Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemists. Arlington, 1992.
- ÁSSIMOS, A.A. **Avaliação da concentração e dos tipos de flavonoides na própolis utilizando métodos quimiométricos de classificação e calibração**. 2014. 103f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Química. Belo Horizonte.
- ATKINS, F.W. **Físico-Química**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos, p. 336–342. 1999.
- AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- AYRES, D.C.; MARCUCCI, M.C.; GIORGIO, S. Effects of Brazilian propolis in *Leishmania amazonensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v.102, n. 2, p. 215-220, 2007.
- AYRES, D.C. et al. Potential utility of hyperbaric oxygen therapy and propolis in enhancing the leishmanicidal activity of glucantime. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 53, n. 3, p. 329–334, 2011.
- BAIOCCO, P. et al. Molecular basis of antimony treatment in leishmaniasis. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 52, p 2603–2612, 2009.
- BANSKOTA, A.H.; TEZUKA, Y; KADOTA, S. Recent progress in pharmacological research of propolis. **Phytotherapy Research**. v. 15, p. 561-571,
- BARBOSA, M.H. et al. Ação terapêutica da própolis em lesões cutâneas. **Acta Paulista de Enfermagem**. v. 22, n. 3, p. 318–322, 2009.
- BEZERRA, G.B. et al. Hydroalcoholic extract of Brazilian red propolis exerts protective effects on acetic acid-induced ulcerative colitis in a rodent model. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 85, p. 687-696, 2017.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Instrução Normativa nº 3 – ANEXO VI – Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de própolis. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 19 jan. 2001.
- BRITO, N.C., RABELLO, A., COTA, G.F. Efficacy of pentavalent antimoniate intralesional infiltration therapy for cutaneous leishmaniasis: A systematic review. **PLoS ONE**. p. 1-29, 2017.

- BUENO-SILVA, B et al. Brazilian red propolis effects on peritoneal macrophage activity: Nitric oxide, cell viability, pro-inflammatory cytokines and gene expression. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 207, p. 100-107, 2017.
- CABRAL, I.S.R. et al. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**. v. 32, p. 1523-1527, 2009.
- CENTROS DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS (CDC), 2017. Disponível em: <[https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/health\\_professionals/index.html](https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/health_professionals/index.html)> Acesso em: 08 nov. 2017.
- CHANG, C. et al. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. **Journal of Food and Drug Analysis**. v. 10, n. 3, p. 178-182, 2002.
- CHANG, R. **Estudos químicos da própolis do estado de Minas Gerais**. 2005. 130f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Química. Belo Horizonte.
- CORNWELL, T.; COHICK, W.; RASKIN, I. Dietary phytoestrogens and health. **Phytochemistry**. v. 65, p. 995-1016, 2004.
- CUESTA-RUBIO, O. Et al. Chemical profile and anti-leishmanial activity of three Ecuadorian própolis samples from Quito, Guayaquil and Cotacachi regions. **Fitoterapia**. v. 120, p. 177-183, 2017.
- DANTAS, D.R.; DOS SANTOS, J.A.; ZOCOLER, M.A. Estabilidade da pomada dermatológica contendo extrato glicólico de *Spondias dulcis* (cajá-manga). **Colloquium Vitae**. v. 6, p. 69-75, 2014.
- DA SILVA, R. A. et al. Características físico-químicas e atividade antimicrobiana de extratos de própolis da Paraíba, Brasil. **Ciência Rural**. v. 36, n. 6, p. 1842-1848, 2006.
- DA SILVA, S.S. et al. Propolis reduces *Leishmania amazonensis*-induced inflammation in the liver of BALB/c mice. **Parasitology Research**. v.115, n. 4, p.1557-1566 2016.
- DAUGSCH, A. et al. Brazilian red propolis – Chemical composition and Botanical Origin. **Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine**. v. 5, n. 4, p. 435-441, 2008.
- DE MENDONÇA, I.C.G. et al. Brazilian red propolis: phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells. **BMC Complementary & Alternative Medicine**. v. 15, n. 357, p. 1-12, 2015.
- DE VRIES, H.J.; REEDJIK, S.H.; SCHALLIG, H.D. Cutaneous leishmaniasis. **Clinics in Dermatology**. v. 25, n. 2, p. 203-211, 2015.
- DOGANYIGIT, Z. et al. Protective effects of própolis on female rats histopathological, biochemical and genotoxic changes during LPS induced endotoxemia. **Phytomedicine**. v. 20, p. 632-639, 2013.
- DO NASCIMENTO, T.G. et al. Polymeric nanoparticles of Brazilian Red Propolis Extract: Preparation, characterization, antioxidante and leishmanicidal activity. **Nanoscale Research Letters**. v. 11, n. 301, p. 1-16, 2016.
- DO RIO, R.G.W. **Métodos de controle químico de amostras de própolis**. 1996. 81f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas. São Paulo.

DUTRA, R.P. et al. Avaliação farmacognóstica de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith da baixada Maranhense. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v. 18, p. 557-562, 2008.

FERNANDES-SILVA, C.C. et al. Chemical profiling of six samples of Brazilian propolis. **Química Nova**, v. 36, p. 237-240, 2013.

FREIRES, I.A.; DE ALENCAR, S.M.; ROSALEN, P.L. A pharmacological perspective on the use of Brazilian Red propolis and its isolated compounds against human diseases. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 110, p. 267-279, 2016.

FRÉZARD F., DEMICHELI C., RIBEIRO, R. Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. **Molecules**. v. 14, p. 2317–2336, 2009.

FROZZA, C. et al. Proteomic analysis identifies differentially expressed proteins after red propolis treatment in Hep-2 cells. **Food and Chemical Toxicology**. v.63, p. 195–204, 2014.

FUNARI, C.S., FERRO, V.O. Análises de propolis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 26, n. 1, p. 171-178, 2006.

GHAFFARPASAND, F. et al. Effect of tropical morphine on cutaneous leishmaniasis in a animal model: a preliminary report. **Iranian Red Crescent Medical Journal**. v. 18, n. 5, e24402, 2016.

GONTIJO, B., DE CARVALHO, M.L.R. Leishmaniose Tegumentar Americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.

HOTEZ, P.J. et al. Combating tropical infectious diseases: report of the Disease Control Priorities in Developing Countries Project. **Clinical Infectious Diseases**. v. 38, n. 6, p. 871–878, 2004.

HOTEZ, P.J. et al. Incorporating a Rapid-Impact Package for Neglected Tropical Diseases with Programs for HIV/AIDS, Tuberculosis, and Malaria. **PLoS Medicine**. v. 3, n. 5, e102, 2006.

IKEGAKI, M. **Determinação da qualidade de própolis de *Apis mellifera* africanizada da região sul do Brasil: avaliação de algumas propriedades físico-químicas e biológicas da própolis.** 2001. 74f. Tese (Doutorado) - Faculdade Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, UNICAMP. São Paulo.

ISLA, M.I. et al. Effect of seasonality on chemical composition and antibacterial and anti candida activities of Argentine propolis. Design of a topical formulation. **Natural Product Communications**. v.7, n. 0, p. 1-2, 2012.

JHA, T.K. Drug unresponsiveness & combinaetion therapy for kala-azar. **Indian Journal of Medical Research**. v.123, p.389-398, 2006.

JORGE, R. et al. Brazilian propolis: seasonal variation of the prenylated p-coumaric acids and antimicrobial activity. **Pharmaceutical Biology**. v. 46, n. 12, p. 889–893, 2008.

KAMIYA, T. et al. Ethanol extract of Brazilian red propolis induces apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through endoplasmic reticulum stress. **Journal of Agricultural and Food Chemical**. v. 60, p. 11065-11070, 2012.

KAWAKITA, E.T. et al. Avaliação da vida útil do extrato hidroalcoólico de propolis mantido sob diferentes temperaturas de armazenamento. **Atas de Saúde Ambiental**. v. 3, n. 2, p. 33-46, 2015.



- KAYE, P., SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews/Microbiology**. v. 9, p. 604-615, 2011.
- KIP, A.E. et al. Clinical Pharmacokinetics of Systematically Administered Antileishmanial Drugs. **Clinical Pharmacokinetics**. 2017.
- KUROPATNICKI, A. K., SZLISZKA, E., KROL, W. Historical aspects of propolis research in modern times. **Evidence - Based Complementary and Alternative Medicine**. v. 2013, p. 1-11, 2013.
- LEONARDI, G. R.; GASPAR, L. R.; CAMPOS, P. M. B. G. M. Estudo da variação do pH da pele humana exposta à formulação cosmética acrescida ou não das vitaminas A, E ou de ceramida, por metodologia não invasiva\*. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v. 77, n. 5, p. 563-569, 2002.
- LI, F. et al. Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure-activity relationship. **Bioorganic & Medical Chemistry**. v. 16, n. 10, p. 5434-5440, 2008.
- LLANOS-CUENTAS, A. et al., Clinical and parasite species risk factors for pentavalent antimonial treatment failure in cutaneous *leishmaniasis* in Peru. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. 2, p. 223–231, 2008.
- LONGHINI, R. et al. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 17, n. 3, p. 388-395, 2007.
- LUCENA, M.N. et al. Avaliação da estabilidade da pomade à base de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Conville e sua eficácia na neutralização dos efeitos locais induzidos pela peçonha de *Bothrops pauloensis*. 2004.
- LUSTOSA, S.R. et al. Própolis: atualizações sobre a química e farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 447-454, 2008
- MACHADO, G.M.C., LEON, L.L., DE CASTRO, S.L. Activity of Brazilian and Bulgarian propolis against different species of *Leishmania*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 102: 73–77, 2007.
- MACHADO, J.L. et al. Brazilian green propolis: anti-inflammatory property by an immunomodulatory activity. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2012.
- MARCUCCI, M.C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. **Química Nova**. v. 19, n. 5, p. 529-536, 1996.
- MARCUCCI, M.C. et al. Chemical composition of Brazilian propolis from São Paulo State. **Zeitschrift Fur Naturforschung**. v. 53, p. 117-119, 1998.
- MARCUCCI, M.C. et al. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**. v.74, p.105–112, 2001.
- MATOUSSI, N. et al. Cardiotoxicity of N-Methyl-Glucamine Antimoniate (Glucantime). A case report. **Medicine Et Maladies Infectieuses**. v. 3: p. 257-259, 2007.
- MEYMANDI, S.S. et al. Comparative histological and immunohistochemical changes of dry type cutaneous leishmaniasis after administration of meglumine antimoniate, imiquimod or combination therapy. **Archives of Iranian Medicine**. v. 14, n. 4, p. 238-243, 2011.

- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Indicação Geográfica - IG. 2012. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/desenvolvimento-sustentavel/indicacao-geografica>> Acesso em: 01 nov 2017.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2. ed. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_vigilancia\\_leishmaniose\\_tegumentar\\_american\\_a.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar_american_a.pdf)> Acesso em: 13 nov 2017.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar. Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_vigilancia\\_leishmaniose\\_tegumentar.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf)>. Acesso em: 7 nov. 2017.
- MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarín Journal of Science and Technology**. v. 26, p. 211-219, 2004.
- MOOSAVIAN KALAT, S.A. et al. Use of topical liposomes containing meglumine antimoniate (Glucantime) for the treatment of *L. major* lesion in BALB/c mice. **Experimental Parasitology**. v. 143, p. 5-10, 2014.
- MOURÃO, L.R.M.B. **Estudo *in vivo* da atividade antioxidante da própolis vermelha brasileira**. 2013. 96 f. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Centro de Energia Nuclear na Agricultura. Piracicaba.
- MOOKERJEE BASU, J. et al. Sodium antimony gluconate induces generation of reactive oxygen species and nitric oxide via phosphoinositide 3-kinase and mitogen-activated protein kinase activation in *Leishmania donovani*-infected macrophages. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 50, p. 1788–1797, 2006.
- NINA, N. et al. Antibacterial and leishmanicidal activity of Bolivian propolis. **Letters in Applied Microbiology**. v. 62, n. 3, p. 290-296, 2016.
- ODA, J.M. et al. Ação do extrato de própolis nas *leishmanioses*. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**. v. 32, n. 1, p. 111–121, 2011.
- OLCZYCK, P. et al. Propolis modified collagen types I and III accumulation in the matrix of burnt tissue. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. doi:10.1155/2013/423809, 2013.
- OLCZYCK, P. et al. Propolis induces chondroitin/dermatan sulfate and hyaluronic acid accumulation in the skin of burned wound. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. doi:10.1155/2013/290675, 2013.
- OLCZYCK, P. et al. Free radical scavenging activity of drops and spray containing propolis – an EPR examination. **Molecules**. v. 22, n. 128, p. 1-10, 2016.
- OLIVEIRA, K.A.M. et al. Atividade antimicrobiana e qualificação de flavonoides e fenóis totais em diferentes extratos de propolis. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**. v. 33, n.2, p. 211-222, 2012.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. WHO Technical Report Series. Control of the leishmaniasis, 2010. Disponível em:

<[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44412/1/WHO\\_TRS\\_949\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44412/1/WHO_TRS_949_eng.pdf)> Acesso em: 13 nov 2017.

ORYAN, A.; AKBARI, M. Worldwide risk factors in leishmaniasis. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**. v. 9, n. 10, p. 925-932, 2016.

OZAN, F. et al. Effect of mouthrinse containing propolis on oral microorganisms and human gingival fibroblasts. **European Journal of Dentistry**. v. 1, p. 195–201, 2007.

OZBILGE, H. et al. Anti-leishmanial activities of ethanolic extract of Kayseri propolis. **African Journal of Microbiology Research**. v.4, n. 7, p. 556-560, 2010.

PAIVA-CAVALCANTI, M. et al., Quantitative real time PCR assays for the detection of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in animals and humans. **Molecular and Cellular Probes**. v. 27, p. 122-128, 1023.

PAIVA-CAVALCANTI, M. et al. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of immunological and molecular tools. **Cell & Bioscience**. v. 5, n. 31, p. 1-10, 2015

PARK, Y.K. et al. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 18, n. 3, 1998.

PARK, Y.K., ALENCAR, S.M., AGUIAR, C.L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 50, p. 2502–2506, 2002.

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M. Classificação das própolis brasileira a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas. Disponível em: <<http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/58/artigo.htm#fig4>>. Acesso em: 28 set 2017.

PEREIRA, A. S., SEIXAS, F.R.M.S., AQUINO-NETO, F.R. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova**. v. 25, n. 2, p. 321-326, 2002.

PEREIRA, E.M.R. et al. Clinical evidence of the efficacy of a Mouthwash containing propolis for the control of plaque and gingivitis: A phase II study. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. p. 1-7, 2011.

PICCINELLI, A.L. et al. Cuban and Brazilian red propolis: Botanical origin and comparative analysis by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 59, p. 6484-6491, 2011.

PONTIN, K. et al. In vitro and in vivo antileishmanial activities of a Brazilian green propolis extract. **Parasitology Research**. v. 103, p. 487-492, 2008.

PRATT, D. E.; BIRAC, P. M. Source of antioxidant activity of soybeans and soy products. **Journal of Food Science**. v. 44, p. 1720-1722, 1979.

REBOUÇAS-SILVA, J. et al. Parasite killing of *Leishmania (V) braziliensis* by standardized propolis extracts. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. p. 1-15, 2017.

REGUEIRA NETO, M.S. et al. Seasonal variation of Brazilian red propolis: Antibacterial activity, synergistic effect and phytochemical screening. **Food and Chemical Toxicology**. v. 107, p. 572-580, 2017.

RIGHI, A.A. **Perfil Químico de Amostras de Própolis Brasileiras**. 2008. 102 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. São Paulo.

RIGHI, A.A. et al. Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 91, n. 13, p. 2363-70, 2011.

RISTIVOJEVIĆ, P. et al. Poplar-type propolis: Chemical composition, botanical origin and biological activity. **Natural product Communications**. v. 10, p. 1869-1876, 2015.

RUFATTO, L.C. et al. Red propolis: Chemical composition and pharmacological activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. v. 7, n. 7, p. 591-598, 2017.

SANTOS, G.S. et al. Effect of Brazilian propolis (AF-08) on genotoxicity, cytotoxicity, cytotoxicity and clonogenic death of Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells irradiated with <sup>60</sup>Co gamma-radiation. **Mutation Research/Genetic Toxicity and Environmental Mutagenesis**. v. 762, p. 17-23, 2014.

SARAVIA, N.G.L. et al. The relationship of *Leishmania braziliensis* subspecies and immune response to disease expression in New World leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**. v. 159, p. 725-735, 1989.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE/MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs>> Acesso em: 13 nov 2017.

SFORCIN, J.M., BANKOVA, V. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? **Journal of Ethnopharmacology**. v. 133, p. 253-260, 2011.

SHAHIAN, M.; ALBORZI, A. Effect of meglumine antimoniate on the pâncreas during treatment of visceral leishmaniasis in children. **Medical Science Monitor**. v. 15, p. 290-293, 2009.

SHALEV, M. et al. Structural basis for selective targeting of leishmanial ribosomes: aminoglycoside derivatives as promising therapeutics. **Nucleic Acids Research**. v. 43, n. 17, p. 8601-8613, 2015.

SILVA, B.B. et al. Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of brazilian propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. v.5, n.3, p. 313-316, 2007.

SIMÕES-AMBROSIO, L.M.C. et al. The role of seasonality on the inhibitory effect of Brazilian green propolis on the oxidative metabolism of neutrophils. **Fitoterapia**, v. 81, p. 1102-1108, 2010.

SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO, 2016. Disponível em: <<http://portalsinan.saude.gov.br/>> Acesso em 8 nov 2017.

SOARES, A.L.N. et al. Identidade e qualidade de diferentes extratos de propolis. **Revista gestão em foco**, Ed. n° 9. p. 255-275, 2017.

SUN, GUANG-WEI et al. Flavonoids extraction from propolis attenuates pathological cardiac hypertrophy through PI3K/AKT signaling pathway. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. p. 1-11, 2016.

TAGLIACOLLO, V.A.; ORSI, R.O. Qualidade da própolis comercializada no Mercado informal. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. V. 31, n. 3, p. 752-757, 2011.

TORETI, V.C. et al. Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. 2013.

TRUSHEVA, B. et al. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. v. 3, n. 2, p. 249–254, 2006.

VELÁSQUEZ, A.M.A. et al. Efficacy of a binuclear cyclopalladated compound therapy for cutaneous leishmaniasis in the murine model of infection with *Leishmania amazonensis* and its inhibitory effect on topoisomerase 1B. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 61, n. 8, p. 1-15, 2017.

XAVIER, J.A. et al. Polyphenol profile by UHPLC-MS/MS, anti-glycation, antioxidant and cytotoxic activities of several samples of propolis from the northeastern semi-arid region of Brazil. **Pharmaceutical Biology**. v. 55, n.1, p. 1884-1893, 2017.

WATERMAN, P.G.; MOLE, S. **Analysis of phenolic plant metabolites**. London, Blackwell Scientific Publications, 1994.

WIWANITKIT, V. Interest in paromomycin for the treatment of visceral leishmaniasis (kala-azar). **Therapeutics and Clinical Risk. Managment**. v. 8, p. 323–328, 2012.

ZAGHLOUL, I.Y.; AL-JASSER, M. Effect of renal impairment on the pharmacokinetics of antimony in hamsters. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**.v. 98, p. 793-800, 2004.

## ANEXOS

### ANEXO A



Ministério da Saúde  
**FIOCRUZ**  
 Fundação Oswaldo Cruz  
 Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

#### COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

##### Certificado de Aprovação

Certificamos que o Projeto intitulado. AVALIAÇÃO DA POTENCIAL ATIVIDADE ANTI-PARASITÁRIA E IMUNOMODULADORA DE COMPOSTOS NATURAIS OU OBTIDOS POR SÍNTESE ORGÂNICA Protocolado sob o N° 26/2011, coordenado pelo (a) pesquisador (a) **VALÉRIA REGO ALVES PEREIRA** está de acordo com a Lei 11.794/2008 e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ Fundação Oswaldo Cruz (CEUA-CPqAM) em reunião 09/02/2012. Na presente versão, este projeto está licenciado e tem validade até fevereiro de 2016

Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie	N° de Animais
CAMUNDONGO MUS MUSCULUS BALB/c 60 dias 20g	600
	<b>TOTAL 600</b>

We certify that the project entitled AVALIAÇÃO DA POTENCIAL ATIVIDADE ANTI-PARASITÁRIA E IMUNOMODULADORA DE COMPOSTOS NATURAIS OU OBTIDOS POR SÍNTESE ORGÂNICA (CEUA Protocol N° 26/2011), coordinated by **VALÉRIA REGO ALVES PEREIRA** is according to the ethical principles in animal research adopted by the Brazilian law 11.794/2008 and so was approved by the Ethical Committee for Animal Research of the Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ Fundação Oswaldo Cruz on February 09, 2012. In the present version this project is licensed and valid until February, 2016

Recife (Pe, Brazil) april 16, 2012.

**Eridan M. Coutinho M. D. Ph.D**  
 Pesquisadora Emérita da FIOCRUZ  
 Coordenadora da CEUA/CPqAM  
 Recife - Brasil

**Dr. Eridan Medeiros Coutinho**

Vice - Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
 Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – FIOCRUZ

Av. Professor Moraes Rego, s/n - Cidade Universitária – Campus da UFPE  
 Recife - PE - CEP: 50.670-420  
 Telefone: (81) 2101-2500/2101-2600 Fax: (81) 3453-1911  
 www.cpqam.fiocruz.br

## ANEXO B



Ministério da Saúde  
**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**  
 Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães

**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

**Certificado de Aprovação**

Certificamos que o Projeto intitulado. AVALIAÇÃO DA POTENCIAL ATIVIDADE ANTI-PARASITÁRIA E IMUNOMODULADORA DE COMPOSTOS NATURAIS OU OBTIDOS POR SÍNTESE ORGÂNICA Protocolado sob o Nº 26/2011, coordenado pelo (a) pesquisador (a) **VALÉRIA REGO ALVES PEREIRA** está de acordo com a Lei 11.794/2008 e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ Fundação Oswaldo Cruz (CEUA-CPqAM) em reunião 09/02/2012. Na presente versão, este projeto está licenciado e tem validade até fevereiro de 2016

Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie	Nº de Animais
CAMUNDONGO MUS MUSCULUS BALB/c 60 dias 20g	600
	<b>TOTAL 600</b>

We certify that the project entitled AVALIAÇÃO DA POTENCIAL ATIVIDADE ANTI-PARASITÁRIA E IMUNOMODULADORA DE COMPOSTOS NATURAIS OU OBTIDOS POR SÍNTESE ORGÂNICA (CEUA Protocol Nº 26/2011), coordinated by VALÉRIA REGO ALVES PEREIRA is according to the ethical principles in animal research adopted by the Brazilian law 11.794/2008 and so was approved by the Ethical Committee for Animal Research of the Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ Fundação Oswaldo Cruz on February 09, 2012. In the present version this project is licensed and valid until February, 2016

Recife (Pe, Brazil) april 16, 2012.

**Eridan M. Coutinho M. D. Ph.D**  
 Pesquisadora Emérita da FIOCRUZ  
 Coordenadora da CEUA/CPqAM  
 Recife - Brasil

**Dr<sup>a</sup>. Eridan Medeiros Coutinho**

Vice - Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
 Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – FIOCRUZ