

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
NÚCLEO DE PESQUISAS EM PLANTAS MEDICINAIS
MESTRADO EM FARMACOLOGIA**

LORENA CITÓ LOPES RESENDE SANTANA

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTI-LEISHMANIA, CITOTÓXICA E
INDUTORA DA SÍNTESE DE ÓXIDO NÍTRICO DE AMOSTRAS DE
PRÓPOLIS E PÓLEN**

**TERESINA
2010**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTI-LEISHMANIA, CITOTÓXICA E
INDUTORÁ DA SÍNTESE DE ÓXIDO NÍTRICO DE AMOSTRAS DE
PRÓPOLIS E PÓLEN**

LORENA CITÓ LOPES RESENDE SANTANA

Dissertação apresentada à
Universidade Federal do Piauí, como
parte da exigência do curso de
Mestrado em Farmacologia, área de
concentração Farmacologia de
antimicrobianos, para obtenção do
título de Mestre.

**Orientador: Prof. Dr. Fernando Aécio de A.
Carvalho**

**TERESINA
2010**

LORENA CITÓ LOPES RESENDE SANTANA

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTI-LEISHMANIA, CITOTÓXICA E
INDUTORA DA SÍNTESE DE ÓXIDO NÍTRICO DE AMOSTRAS DE
PRÓPOLIS E PÓLEN**

Dissertação apresentada
à Universidade Federal do Piauí,
como parte da exigência do
curso de Mestrado em
Farmacologia, área de
concentração Farmacologia de
antimicrobianos, para obtenção
do título de Mestre

Aprovada em: __/__/____

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. FERNANDO AÉCIO DE AMORIM CARVALHO

1º Examinador: Profa. Dra. REGINA CELIA BRESSAN Q. DE
FIGUEIREDO

2º Examinador: Prof. Dr. LÍVIO CESÁR CUNHA NUNES

Dedico esta dissertação aos meus pais, Graça e Arimatéia, minha fonte de inspiração, pelo incentivo e apoio, ao meu marido Tércio pelo companheirismo e aos meus irmãos pelo carinho.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por ter me guiado durante essa jornada;

Aos meus pais, **Graça e Arimatéia**, pelo exemplo, amor, carinho, confiança, dedicação, ajuda, incentivo e apoio sempre é por causa de vocês que cheguei até aqui;

Ao meu marido, **Tércio**, pelo carinho, companheirismo, amor, respeito, por está ao meu lado sempre que precisei;

Aos meus irmãos, **Lara e Alexandre**, pelo carinho e torcida;

Ao meu orientador, **Prof. Fernando Aécio de Amorim Carvalho**, pela grande amizade, ensinamentos, dedicação, companheirismo, boa vontade de me orientar e por confiar na minha capacidade;

À **CAPES** pela concessão da bolsa

Ao **Prof. José Machado Moita Neto**, pela disponibilidade, amizade e contribuição dada quando solicitado;

À **Profa. Regina Celia Bressan Queiroz de Figueiredo**, pela contribuição, carinho e atenção.

À amiga **Sabrina Carneiro**, pelo valioso auxílio na realização dos experimentos e pela grande amizade;

Ao amigo **Charllyton Luís Sena da Costa**, pela amizade, por me ajudar na elaboração do meu projeto e por fornecer o material bruto para a realização desse trabalho;

Aos professores, funcionários e colegas do **Núcleo de Pesquisas em Plantas Mediciniais** da Universidade Federal do Piauí;

Aos colegas do **Laboratório de Atividade Anti-leishmania**, pela ajuda durante a execução da parte experimental desse trabalho;

Aos colegas do **Laboratório de Produtos Naturais**, por fornecerem extratos, me ajudando na busca constante do material usado para esse trabalho;

Às meninas do **Instituto de Pesquisa Aggeu Magalhães**, pela acolhida, colaboração e amizade;

A todos que fizeram parte dessa jornada, muito obrigada!

RESUMO

Os produtos da colméia: o pólen e própolis, são conhecidos por suas atividades antioxidante e imunomodulador. A própolis, em particular, tem ainda vários outros efeitos farmacológicos, tais como anti-inflamatório, antimicrobiana e hepatoprotetora. Esta diversidade de atividades aliada à composição química complexa desses produtos, tem atraído o interesse em novas pesquisas que visam a descoberta de novas atividades farmacológicas da mesma. Nesse sentido, o estudo da atividade de tais produtos sobre *Leishmania amazonensis*, agente etiológico de leishmaniose cutânea, que constitui um sério problema para a saúde em todo o mundo. Esta doença é difícil de ser controlada, porque não há uma vacina eficaz disponível e os tratamentos baseados em antimonial pentavalentes, anfotericina B e pentamidina são muito tóxicos e caros. Uma alternativa seria o uso de produtos à base de plantas, comumente utilizados na medicina popular para tratar várias infecções, incluindo doenças parasitárias. Este estudo investigou o efeito destes dois produtos da colmeia sobre a *L. amazonensis*. Em primeiro lugar, nós avaliamos os extratos hidroalcoólicos de pólen e própolis contra promastigotas, comparando a própolis marrom (extrato e frações) e vermelha (apenas o extrato), bem como o pólen. Nossos resultados mostraram que somente a própolis causa significativa inibição do crescimento de parasitas, sendo os efeitos semelhantes para ambos os tipos de própolis. Nós também analisamos os efeitos citotóxicos de produtos apícolas e a produção de óxido nítrico por células de mamíferos, bem como, sua atividade contra formas amastigotas intracelulares. O extrato hidroalcoólico e as frações (acetato de etila, diclorometano e hexano) de própolis marrom mostraram-se eficazes em diminuir infecção de macrófaga, bem como o número de amastigotas internalizados nestas células, sendo a fração diclorometano a que apresentou o melhor efeito e índice de seletividade (maior toxicidade para o parasita do que para os macrófagos) em todas as concentrações testadas. Nenhum dos extratos ou frações foi capaz de induzir o óxido nítrico, sugerindo que a atividade anti-*Leishmania* não está diretamente relacionada com tal mecanismo.

Palavras-chave: *Leishmania amazonensis*, própolis, pólen, promastigota, amastigota e óxido nítrico.

ABSTRACT

The hive products: pollen and propolis, are noted for their antioxidant and immunomodulatory activities. Propolis, in particular, still has several other pharmacological effects, such as anti-inflammatory, antimicrobial and hepatoprotective. This diversity of activities allied to the complex chemical composition of such products, has been attracted interest in new research aimed at discovering of new pharmacological activities thereof. In this sense, the study of activity of such products on the *Leishmania amazonensis*, etiologic agent of cutaneous leishmaniose, which is a serious health problem concerning worldwide as performed. This disease is difficult to control because there is no effective vaccine available and the treatment based on pentavalent antimonials, amphotericin B and pentamidine are very toxic and expensive. An alternative would be the use of herbal products, commonly used in folk medicine to treat various infections, including parasitic diseases. This study investigated the effect of these two products from the hive on the *L. amazonensis*. Firstly, we evaluated hydroalcoholic extracts of pollen and propolis against promastigotes, by comparing the brown propolis (extract and fractions) and red (only your extract) as well as the pollen. Our results showed that only propolis cause significant growth inhibition of parasites being the effects similar for both kind of propolis. We also analyzed the cytotoxic effect of hive products and the nitric oxide production by mammalian cells, as well as, evaluated their activity against intracellular amastigote forms. The hydroalcoholic extract and the fractions (ethyl acetate, dichloromethane and hexane) of brown propolis showed effective in decrease macrophages infection as well as the number of internalized amastigotes in these cells being the dichloromethane fraction which presented the better effect and selectivity index (higher toxicity to the parasite than for macrophages) at all tested concentrations. None of the extracts or fractions were able to induced nitric oxide, suggesting that the anti-leishmania activite is not directly related to such mechanism.

Keywords: *Leishmania amazonensis*, propolis, pollen, promastigote, amastigote, nitric oxide.

LISTA DE FIGURAS E FLUXOGRAMAS

FIGURA 1. Ciclo biológico da leishmania nos hospedeiros vertebrado e invertebrado.

FIGURA 2. Coleta de macrófagos residentes da cavidade peritoneal de camundongos. A: retirada da pele do animal; B: administração de PBS no peritônio e C: aspiração do exsudado peritoneal contendo as células.

FIGURA 3. Reação de redução do MTT para formazan

FIGURA 4. Leitora de placa contendo a placa para avaliação da citotoxicidade.

FIGURA 5. Inibição *in vitro* das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* pela fração PM - Diclorometano da própolis marrom, para os tempos de 24, 48 e 72 horas de incubação.

FIGURA 6. Inibição *in vitro* das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* pelo extrato PM - Hidroalcoólico da própolis marrom, para os tempos de 24, 48 e 72 horas de incubação.

FIGURA 7. Inibição *in vitro* das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* pelo extrato PV - Hidroalcoólico da própolis vermelha, para os tempos de 24, 48 e 72 horas de incubação.

FIGURA 8. Inibição *in vitro* das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* pela fração PM – Acetato de Etila da própolis marrom, para os tempos de 24, 48 e 72 horas de incubação.

FIGURA 9. Inibição *in vitro* das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* pela fração PM – Hexânica da própolis marrom, para os tempos de 24, 48 e 72 horas de incubação.

FIGURA 10. Microscopia ótica de cultivo de macrófagos peritonias (2x10⁵ células/poço) infectados com *Leishmania amazonensis* (2x10⁶ promastigotas/poço) e incubados com 48 horas a 37°C e a 5% de CO₂. **A, B e C** correspondem a macrófagos dos grupos tratados com PM – Diclorometano a 12,5 µg/mL. **D, E e F** correspondem a macrófagos do grupo controle. Setas indicam formas amastigotas internalizadas. Aumento de 1000x.

FIGURA 11. Efeito da fração acetato de etila de própolis marrom sobre a infecção de macrófagos com *L. amazonensis* após tratamento de 48 horas.

FIGURA 12. Efeito da fração diclorometano de própolis marrom sobre a infecção de macrófagos com *L. amazonensis* após tratamento de 48 horas.

FIGURA 13. Efeito do extrato hidroalcolico de própolis marrom sobre a infecção de macrófagos com *L. amazonensis* após tratamento de 48 horas.

FIGURA 14. Dosagem colorimétrica de nitrito para avaliação indireta de produção de óxido nítrico por macrófagos (1×10^5 /poço) incubados com diferentes concentrações (25; 12,5; 6,25 e 3,12 μ g/mL) de extratos e suas frações.

FLUXOGRAMA 1. Classificação taxonômica das abelhas com suas respectivas famílias.

FLUXOGRAMA 2. Classificação taxonômica de abelhas da família *Apidae*, subdividindo-a em subfamílias, tribo, subtribos e seus respectivos gêneros.

FLUXOGRAMA 3. Fracionamento da própolis marrom a partir do extrato hidroalcolico, para obtenção das frações hexânica, diclorometano e acetato de etila.

LISTA DE QUADROS E TABELAS

QUADRO 1. Classes químicas de compostos com atividade leishmanicida e respectivas referências.

TABELA 1. Concentração em $\mu\text{g/mL}$ capaz de inibir 50% das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (CI_{50}) em 24 horas.

TABELA 2. Concentração em $\mu\text{g/mL}$ capaz de inibir 50% das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (CI_{50}) em 48 horas.

TABELA 3. Concentração em $\mu\text{g/mL}$ capaz de inibir 50% das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (CI_{50}) em 72 horas.

TABELA 4. Concentração em $\mu\text{g/mL}$ dos extratos hidroalcoólicos da própolis vermelha (PV) e da própolis marrom (PM) e das frações da própolis marrom capaz de reduzir 50% da viabilidade dos macrófagos (CC_{50}) em 48 horas.

TABELA 5. Relação entre a toxicidade do extrato para o parasito e a toxicidade dos extratos hidroalcoólicos de própolis vermelha (PV) e própolis marrom (PM) ou frações da PM para as células do hospedeiro (índice de seletividade).

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AcOEt – Acetato de Etila

Al – Alumínio

ANOVA – Análise de variância

B.O.D. – Demanda Bioquímica de Oxigênio

Ca – Cálcio

CC – Concentração citotóxica

CCS – Centro de Ciências de Saúde

CFMV – Conselho Federal de Medicina Veterinária

CH₂Cl₂ ou DCM – Diclorometano

CI – Concentração inibitória

CO₂ – Dióxido de carbono

Cr - Cromo

CRMV – Conselho Regional de Medicina Veterinária

Cu – Cobre

DMSO - Dimetilsulfóxido

EHP – Extrato hidroalcolico de própolis

Ext - Extrato

Fr - Fração

g – grama

HEX – Hexânico

Hidro – Hidroalcolico

HIV – Vírus da imunodeficiência adquirida

H₂O - Água

MeOH – Metanol

µg – micrograma

mg - miligrama

µL- microlitro

mL – mililitro

Mn – Mangânes

MTT – (3-[4,5-dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide thiazolyl blue)

Ni – Níquel

NPPM – Núcleo de Pesquisa em Plantas Medicinais

PBS – Tampão fosfato de salina

PM – Própolis marrom

PV – Própolis vermelha

Rpm – Rotações por minuto

SBQ – Sociedade Brasileira de Química

SFB – Soro fetal bovino

SFM – Sistema fagocítico mononuclear

V – Vanádio

UFPI – Universidade Federal do Piauí

Zn - Zinco

SUMÁRIO

| | |
|--|----------|
| 1. Introdução | 4 |
| 1.1. Produtos Naturais | 4 |
| 1.2. Abelhas | 7 |
| 1.3. Própolis | 9 |
| 1.4. Pólen | 2 |
| 1.5. Leishmanioses | 4 |
| 2. Objetivos | 9 |
| 2.1. Geral | 9 |
| 2.2. Específico | 9 |
| 3. Material e Métodos | 0 |
| 3.1. Drogas, reagentes e meios de cultivo celular | 0 |
| 3.2. Equipamentos | 0 |
| 3.3. Coleta e obtenção dos extratos de pólen e própolis | 1 |
| 3.3.1. Coleta das amostras | 1 |
| 3.3.2. Obtenção dos extratos | 1 |
| 3.3.3. Fracionamento do extrato da própolis marrom | 1 |

| | |
|--|---|
| | 2 |
| 3.4. Animais | |
| | 3 |
| 3.5. Parasitos e células | |
| | 4 |
| 3.6. Avaliação dos extratos sobre formas prosmatigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> | |
| | 4 |
| 3.7. Avaliação da citotoxicidade | |
| | 4 |
| 3.7.1. Obtenção dos macrófagos | |
| | 4 |
| 3.7.2. Avaliação da citotoxicidade pelo MTT | |
| | 5 |
| 3.8. Avaliação dos extratos e frações sobre formas amastigotas | |
| | 7 |
| 3.9. Preparação de cultura de macrófagos para quantificação de óxido nítrico | |
| | 8 |
| 3.9.1 Dosagem colorimétrica de nitrito | |
| | 8 |
| 3.10. Eutanásia dos animais utilizados no protocolos | |
| | 8 |
| 3.11. Análise estatística | |
| | 9 |
| 4. Resultados | |
| | 0 |
| 4.1. Avaliação dos extratos e frações sobre formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> | |
| | 0 |
| 4.2. Avaliação da citotoxicidade | |
| | 6 |
| 4.3. Avaliação dos extratos e frações sobre formas amastigotas de | |

| | |
|---|----------|
| <i>Leishmania amazonensis</i> | 8 |
| 4.4. Quantificação de óxido nítrico produzido por dosagem colorimétrica de nitrito | 2 |
| 5. Discussão | 3 |
| 6. Conclusões | 7 |
| 7. Referências | 8 |

1. INTRODUÇÃO

1.1. Produtos Naturais

Os produtos naturais são utilizados pela humanidade desde tempos imemoriais. A busca por alívio e cura de doenças pela ingestão de ervas e folhas talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais. A história do desenvolvimento das civilizações Oriental e Ocidental é rica em exemplos da utilização de recursos naturais na medicina, no controle de pragas e em mecanismos de defesa, merecendo destaque as civilizações Egípcia, Greco-romana e Chinesa. A medicina tradicional chinesa desenvolveu-se com tal grandiosidade e eficiência que até hoje muitas espécies e preparados vegetais medicinais são estudados na busca pelo entendimento de seu mecanismo de ação e no isolamento dos princípios ativos (VIEGAS et al., 2006).

A natureza, de forma geral, tem produzido a maioria das substâncias orgânicas conhecidas. Entretanto, é o Reino Vegetal que tem contribuído de forma mais significativa para o fornecimento de substâncias úteis ao tratamento de doenças que acometem os seres humanos. A fantástica variedade e complexidade de metabólitos especiais biossintetizados pelas plantas teriam se formado e evoluído, como mecanismo de defesa desses vegetais às condições ambientais ricas em microrganismos, insetos, animais e também às condições de adaptação e regulação (REINBOTHE et al., 1990; MONTANARI e BOLZANI, 2001).

No início, os químicos estudavam plantas consagradas pelo uso popular, geralmente incorporadas às farmacopéias da época, limitando-se ao isolamento e à determinação estrutural de substâncias ativas. Dada a importância das plantas para a terapêutica da época, a Química e a Medicina passaram a ter uma estreita relação, o que permitiu um rápido desenvolvimento de seus campos específicos (YUNES et al., 2001). Desta forma, muitas substâncias ativas foram conhecidas e introduzidas na terapêutica, permanecendo até hoje como medicamentos. Alguns exemplos já foram descritos como os alcalóides de *Cinchona* e de *Papaver* (VIEGAS et al., 2006).

O isolamento de produtos naturais em forma pura, no final do século XIX, foi um passo decisivo para a criação da indústria farmacêutica. Durante a primeira fase os produtos naturais se constituíram na principal fonte de insumos para a preparação de medicamentos (COSTA, 2009).

Detentores de um mercado extremamente lucrativo, os fitofármacos, como por exemplo, ginkgo, kava pironas, ginseng, erva de são joão, dentre outros, reacenderam o interesse da indústria farmacêutica pelos produtos de origem vegetal. Por volta de 1990, estimou-se que cerca de 80% da população mundial procuravam nas plantas a fonte principal de medicamentos (FLEURETIN e PELT, 1990).

No Brasil, o uso das plantas medicinais foi disseminado principalmente pela cultura indígena. É um país rico em diversidade biológica, cujo território possui cinco principais biomas a floresta amazônica, cerrado, mata atlântica, pantanal e caatinga. Portanto, é uma rica fonte de produtos terapêuticos. No entanto, este potencial para a descoberta de plantas como fonte de novas drogas é pobremente explorado ou regulamentado, contrastando com o que ocorre em países como Alemanha, Estados Unidos e Canadá (CALIXTO, 2000; RATES, 2001; VEIGA-JUNIOR, 2008).

A busca pelas populações por estas plantas incentivou os pesquisadores e a indústria farmacêutica a investirem mais nas pesquisas de novos fármacos. Com o objetivo de minimizar a carência de informações sobre plantas medicinais, pessoas de vários campos de conhecimento se agruparam formando equipes multidisciplinares de pesquisadores e, com o apoio da Organização Mundial da Saúde (OMS), investigam melhores condições para manter a qualidade, a eficácia e a segurança desses medicamentos. As principais ciências envolvidas são a Botânica, a Química e a Farmacologia e, as que estão relacionadas aos costumes, cultura e utilização das plantas são a Antropologia, a Agronomia e a Biotecnologia (RATES, 2001; SOARES et al., 2006; SOUSA et al., 2008).

Na pesquisa com plantas medicinais existem critérios adequados na seleção das espécies vegetais para sucesso na investigação farmacológica. Segundo Holetz e colaboradores (2002), a abordagem com base no conhecimento popular (etnodirigida) é a mais utilizada e mais eficaz aumentando a possibilidade de se descobrir novos compostos. Portanto, as

plantas utilizadas na medicina popular são de grande importância na descoberta de novos fármacos, pela presença de uma gama de compostos das mais variadas estruturas e pela fácil acessibilidade e abundância, principalmente no Brasil, detentor da maior biodiversidade vegetal do mundo (FERNANDES, 2009).

A indústria farmacêutica motivada, em parte, pela descoberta de quimioterápicos eficazes como vimblastina, vincristina, podofilotoxina e os análogos etoposídeo e teniposídeo, camptotecina e taxol, reativou o interesse pelos medicamentos de origem vegetal, principalmente pela busca de substâncias com estruturas moleculares complexas, praticamente impossíveis de serem obtidas por um processo sintético de custo racional (MONTANARI e BOLZANI, 2001). Com objetivos muito bem definidos, a indústria farmacêutica não despreza o potencial que as plantas possuem em fornecer substâncias novas (MONTANARI, 1995).

Os produtos naturais bioativos têm grande importância econômica como especialidades químicas. Eles podem ser utilizados como medicamentos, ferramentas biológicas e farmacológicas, precursores para a síntese de outros produtos e excipientes (PIETERS e VLIETINCK, 2005).

Os produtos naturais dentro do mercado farmacêutico mundial são de grande importância, visto que 25% dos medicamentos prescritos nos países industrializados são derivados de plantas e indo mais além, algo em torno de 44% de todas as novas drogas possuem alguma relação com plantas. Fica evidente, então, a importância da bioprospecção de novos compostos em fontes vegetais de forma a atender à demanda por novos agentes com atividade terapêutica (SANTOS, 2009).

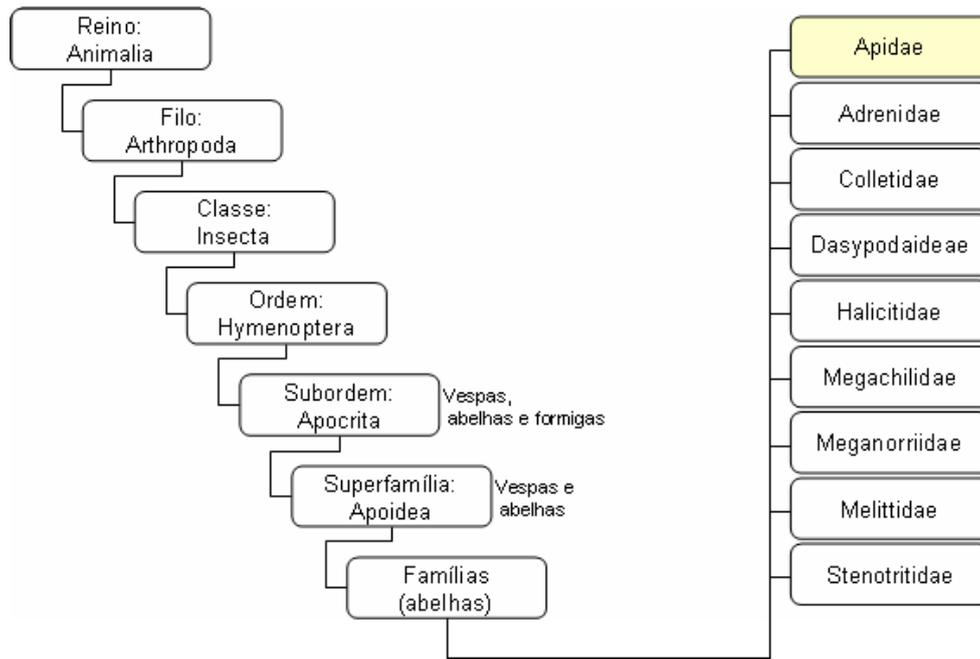
O homem moderno tem procurado por produtos naturais com propriedades medicinais, particularmente aqueles obtidos a partir de plantas e abelhas (TORRES, 2008). A apicultura é um ramo da agricultura definido como uma atividade primária de subsistência ou de comercialização de produtos obtidos da colméia. Dentre eles destacam-se o mel e a própolis, mas outros produtos são obtidos como a geléia real, a cera, apitoxina e o pólen (BRASIL, 2001). A função do pólen para a colméia é ser a principal fonte protéica para as larvas e abelhas adultas e para o homem é ser um excelente suplemento alimentar (IOIRICH, 1986), sendo comercializado na forma de pó, grânulos e

cápsulas. Para a apicultura o pólen desempenha outro papel, determinar um dos parâmetros de qualidade do mel: a origem botânica e geográfica, o que originou outros ramos de estudos do pólen, a Palinologia que é a Ciência que estuda a morfologia de grãos de pólen, esporos e microfósseis e a Melissopalínologia que estuda os tipos polínicos presentes em méis de abelhas (BARTH, 2004; LIMA NETO, 2009).

1.2. Abelhas

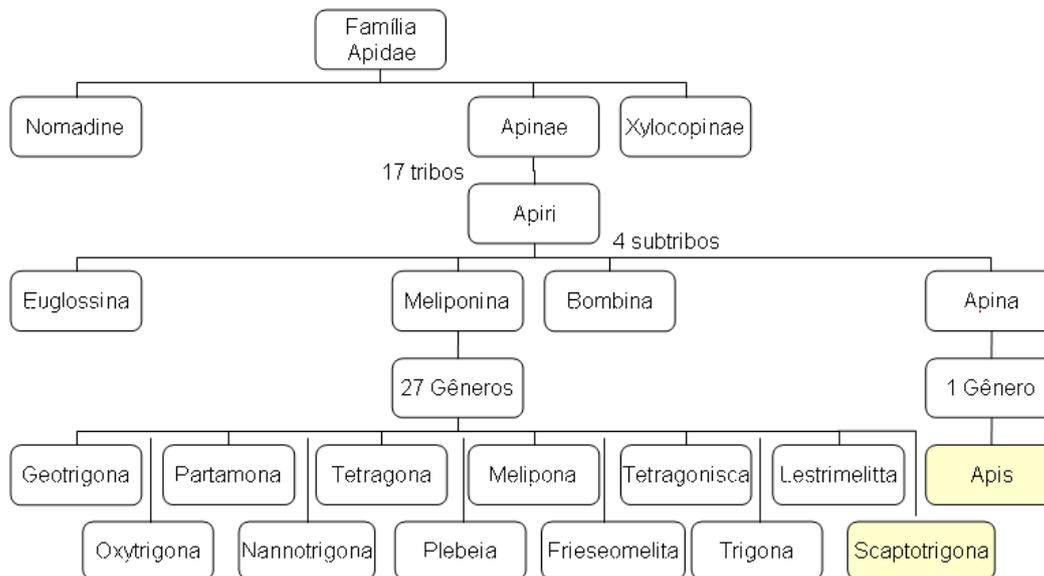
As abelhas são indivíduos do reino animal, pertencem ao filo artrópode e a classe insecta (Fluxograma 1). São os principais polinizadores do planeta, responsáveis por 80% da polinização nos ecossistemas tropicais que constituem a principal fonte de recurso alimentar para aves e mamíferos (VIEIRA et al., 2008). A hipótese mais aceita hoje é que as abelhas são descendentes de vespas da superfamília apoidea, que evoluíram em ambiente dominado por plantas com flores. Na classificação, há nove famílias de abelhas: *melittidae*, *stenotritidae* e *meganomiidae* (estas três ausentes no Brasil), *andrenidae*, *halictidae*, *dasypodaidae*, *colletidae*, *megachilidae* e *apidae* (SILVEIRA, MELO, ALMEIDA, 2002).

Neste estudo foram utilizados o pólen e a própolis ambos de abelhas da família *Apidae*, no entanto, pertencentes a gêneros diferentes. O pólen foi obtido de abelhas do gênero *Scaptotrigona*, espécie não identificada e a própolis marrom e a vermelha de abelhas do gênero *Apis* (Fluxograma 2)



Adaptado de LIMA NETO, 2009.

Fluxograma 1: Classificação taxonômica das abelhas com suas respectivas famílias.



Segundo SILVEIRA, MELO, ALMEIDA, (2002).

Fluxograma 2: Classificação taxonômica de abelhas da família *Apidae*, subdividindo-a em subfamílias, tribo, subtribos e seus respectivos gêneros.

1.3. Própolis

A palavra própolis é derivada do grego pro, em defesa de, e polis, a cidade, o que quer dizer “em defesa da cidade ou da colméia” (SILVA et al., 2005).

A própolis é um produto elaborado na colméia a partir de substâncias resinosas, gomosas e balsâmicas, coletada pelas abelhas, da espécie *Apis mellifera*, de brotos de flores e exsudados de plantas, acrescida de secreções salivares, cera e pólen. As abelhas utilizam a própolis para recobrir a parede da colméia, reforçar os favos, preencher as fissuras, restringir a entrada, e embalsamar animais, que tenham sido mortos após invasão da colméia (SIMÕES et al., 2004 e BANKOVA, 2005).

Poucas espécies de abelhas têm a capacidade de produzir própolis. Em geral, as abelhas africanizadas, resultantes do cruzamento da *Apis mellifera* européia com a *Apis mellifera scutellata* africana, têm maior capacidade genética de produzir própolis. Segundo Santos et al., (1996), as abelhas africanizadas realizam um maior número de coletas de substâncias para a elaboração de própolis nos horários mais quentes do dia (entre 10 e 14 horas). Temperaturas abaixo de 21 °C ou acima de 28 °C aparentemente inibem este comportamento (TORRES, 2007).

A própolis é um dos muitos produtos naturais que vem sendo utilizado durante séculos pela humanidade (VARGAS et al., 2004). Os egípcios conheciam as propriedades anti-putrefativas da própolis e a empregavam para embalsamar cadáveres. Além disso, foi reconhecida por suas propriedades medicinais por médicos gregos e romanos como Aristóteles, Dioscorides, Plínio e Galeno (CAPASSO e CASTALDO, 2002). O uso de extratos de própolis na medicina popular data de 300 a.C. (DA SILVA et al., 2006).

A própolis começou a ser apreciada como meio para tratamento de problemas de saúde nos anos de 1950 e 1960 na ex-União Soviética e em países do leste da Europa, como Bulgária, República Tcheca e Polônia. Nos países do Oeste Europeu, na América do Sul e do Norte e no Japão, própolis não adquiriu popularidade até 1980. Na metade dos anos 80, a própolis tornou-se um importante produto na medicina alternativa e complementar. Japão é o

principal importador de própolis, com preferência pela própolis brasileira (SALATINO et al., 2005).

A composição química da própolis é bastante complexa e variada, estando intimamente relacionada com a ecologia e a flora de cada região visitada pelas abelhas e com o período de coleta da resina. Além disso, a variabilidade genética das abelhas rainhas também influencia na composição química (PARK et al., 1998; PARK et al., 2002; TORRES, 2007).

Considerada uma das mais complexas fontes naturais de compostos químicos, já foram identificadas mais de 300 substâncias na própolis, incluindo ácidos fenólicos, flavonóides, ésteres, diterpenos, triterpenos, sesquiterpenos, lignanas, aldeídos e ácidos aromáticos, álcoois, aminoácidos, ácidos graxos, vitaminas (A, B1, B2, B6, C e E) e minerais, como Manganês, Cobre, Cálcio, Alumínio, Vanádio, Níquel, Zinco e Cromo (MARCUCCI 1995; BANKOVA, 2000; SILVA et al., 2005; SOUSA et al., 2006).

Nos últimos anos, um grande número de outras substâncias foram relacionado à própolis. Entre os seus principais constituintes destacam-se os flavonóides aglicona e os ácidos fenólicos e seus ésteres (MARCUCCI, 1995), aos quais são atribuídos boa parte das atividades biológicas constatadas para a própolis (FUNARI e FERRO, 2006).

Kumazana et al. (2004), compararam os teores de substâncias fenólicas de própolis de diferentes origens geográficas, tendo a própolis brasileira apresentado teor inferior ao das demais amostras. Estes resultados sugerem que o valor terapêutico da própolis brasileira estaria em sua composição diferenciada, em termos de substâncias fenólicas, e não no teor total destas substâncias. De fato, diversos autores têm demonstrado que a própolis brasileira é rica em ácidos fenólicos prenilados (MARCUCCI et al., 1998; BANKOVA et al., 1998), diferenciando-se de amostras de zonas temperadas, mais ricas em flavonóides.

Há muitos séculos a própolis vem sendo utilizada pelo homem na medicina popular e isto se deve a algumas propriedades farmacológicas apresentadas por este produto, tais como: atividade antimicrobiana, antiinflamatória, antifúngica, antitumoral, hepatoprotetora, antiviral, antioxidante, antiséptico, antihipertensiva, imonomodulatória e “varredora de radicais livres”. Existem relatos do seu uso também para doenças cardíacas,

diabetes, tratamentos de doenças inflamatórias crônicas como artrite e como anestésico local. E ainda seu efeito sinérgico com outras drogas no tratamento da tuberculose (PIETTA et al., 2002; BLONSKA et al., 2004; KARTAL et al., 2003; LIU et al., 2004; PRYTZYK et al., 2003; SIMÕES et al., 2004; KUMAZAWA et al., 2004; NUNES, 2008; PAGLIARONE et al., 2009).

Possui grande importância medicinal e econômica, sendo comercializada em várias preparações farmacêuticas e cosméticas, tais como: comprimidos, pastilhas, dentifrícios, loções, cremes faciais, tinturas e pomadas (BANKOVA et al., 2000; PARK et al., 2002). Tem sido observado um aumento significativo do interesse da população pelo produto, do número de criadores de abelhas que investem na melhoria da produção da própolis e de empresas processadoras deste material (PEREIRA et al., 2002). Entretanto, apesar desse aumento e do fato de existir uma considerável quantidade de informações disponíveis no que concerne aos aspectos químicos e biológicos da própolis, sua aplicação terapêutica ainda pode ser considerada incipiente (FUNARI e FERRO, 2006).

No Brasil, o interesse pela própolis aconteceu somente na década de 80 com o trabalho pioneiro de Ernesto Ulrich Breyer, demonstrando em seu livro, "Abelhas e saúde", as propriedades terapêuticas da própolis e sua utilização como antibiótico natural (LIMA, 2006).

No Estado do Piauí, os apicultores dedicam-se quase que exclusivamente à produção de mel, destinado principalmente ao mercado externo. A produção de própolis no Estado é incipiente e seu desenvolvimento requer orientação e estímulo dos órgãos de fomento à pesquisa agropecuária. Como o mel produzido no Piauí é predominantemente polifloral, e considerando-se que as abelhas retiram o néctar das flores para produzir o mel, recolhem o pólen para alimentar suas larvas e transportam as substâncias resinosas secretadas pelas plantas para elaborar a própolis, pode-se supor que várias espécies vegetais visitadas pelas abelhas contribuam para a produção da própolis piauiense (TORRES, 2007).

1.4. Pólen

Outro produto encontrado nas colméias é o pólen de abelhas, que consiste de pólen botânico coletado de diversas espécies de plantas por abelhas operárias combinado com néctar e secreções salivares. Juntamente com o néctar, o pólen apícola é a principal fonte de alimento protéico para as abelhas (TORRES et al., 2008).

O pólen botânico, ou simplesmente grão de pólen, é o gameta haplóide masculino das plantas fanerógamas encontrado nos estames das flores gerados por meiose com função de realizar a fecundação do pistilo das flores, dando origem a um novo indivíduo, o zigoto (CAMARGO et al., 2006).

O pólen de abelhas, popularmente denominado “samburá” é resultado da aglutinação do pólen botânico, efetuada pelas abelhas operárias, mediante néctar e suas secreções salivares, transportado em suas corbículas (estruturas curvas presentes nas abelhas da tribo Apini) o qual é recolhido na entrada da colméia. Vale ressaltar que na literatura existe uma distinção dos tipos de pólen: o apícola, obtido em colméias de abelhas do gênero *Apis*, sendo este comercializado e classificado como pólen apícola propriamente dito (em sua forma original) e pólen apícola desidratado. Além disso, existe o pólen de abelhas sem ferrão ou nativas que se refere às abelhas da subtribo Meliponina. O pólen é a principal fonte de alimento protéico principalmente para as larvas que por ano consomem cerca de 125 mg, mas todas as abelhas devem consumi-lo para se manterem vivas. Outra ação do pólen, na colméia, é a de estimular a produção ovariana da rainha, isso sugere que a utilização do pólen é diretamente proporcional ao crescimento populacional da colméia (NOGUEIRA-NETO, 1997; HRASSNIGG e CRAILSHEIM, 1998; BRASIL, 2001; SOMERVILLE, 2001; ZERBO, et al., 2001; HUMAN et al., 2007).

A importância do pólen não é apenas botânica, está correlacionada com outras áreas do conhecimento humano. Seu estudo apresenta um impacto no desenvolvimento de novas tecnologias e incrementa relações ecológicas e atividades econômicas (LIMA NETO, 2009).

O pólen é utilizado para a suplementação alimentar, tratamento de infecções respiratórias, desordens endócrinas, enterites, colites, constipação,

prostatites crônicas, e fortalecimento do sistema imunológico (KROYER e HEGEDUS, 2001; SOUZA, et al., 2004).

A composição química de pólen de abelhas do gênero *Apis* e dos meliponídeos, pode variar bastante, devido principalmente a sua origem botânica. Os constituintes químicos majoritários são as proteínas (aminoácidos, enzimas e proteína bruta), carboidratos, lipídeos, vitaminas (vitamina C em muitos casos é predominante), sais minerais, além de carotenóides, flavonóides e fitosteróis, sendo o motivo da sua utilização como alimento alternativo e/ou suplemento alimentar (LEJA, et al., 2007). Além do Brasil, o pólen apícola tem seu uso aprovado como suplemento alimentar na Suíça e Argentina (ALMEIDA-MURADIAN et al., 2005).

Dentre os efeitos farmacológicos, *in vivo* ou *in vitro*, do pólen, destaca-se a atividade antioxidante e seu efeito como “varredor de radicais livres” (LEJA, et al., 2007; CARPES, et al., 2008).

A análise palinológica do pólen estudado realizada no Instituto de Botânica de São Paulo pela Dra. Cynthia Fernandes Pinto da Luz, apresentou como pólen dominante o de *Mimosa caesalpinifolia* Benth, com 70% de teor. Esta planta é vulgarmente conhecida como “Unha-de-gato”, no Estado do Piauí.

Segundo Santos (2008) a região de Monsenhor Gil é típica de cerrado e a *M. caesalpinifolia* Benth é muito comum, sendo uma das plantas mais visitadas pelas abelhas para a obtenção de pólen e néctar. É importante ressaltar que, em estudos realizados pelo Laboratório de Atividade Anti-Leishmania do Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais da Universidade Federal do Piauí, extratos aquosos liofilizados das folhas e dos frutos desta planta mostraram-se inativos contra formas promastigotas de *Leishmania* sp. (dados não publicados).

A composição química da amostra de pólen estudada é complexa, mas mostrou entre os constituintes fixos majoritários uma predominância de açúcares, particularmente monossacarídeos, com um teor de 55% de metil- α -monofuranosídeo de acordo com os dados de Lima Neto (2009). Ainda segundo o mesmo autor, a composição em constituintes voláteis dessa amostra foi muito variada e um total de 49 substâncias foram identificadas,

destacando-se os ésteres, seguidos dos terpenóides e hidrocarbonetos. E dentre os ésteres os mais abundantes foram: o hexadecanoato de etila (22,74%) e o *z,z*-linoleato de etila (11,91%). Ressalta-se também que na revisão de produtos naturais com atividade leishmanicida realizada por Rocha et al. (2005), dentre as 239 substâncias relacionadas isoladas de plantas, nenhuma foi identificada no estudo realizado por Lima Neto (2009).

1.5. Leishmanioses

No homem, as Leishmanioses representam um complexo de patologias associadas à infecção de células do Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM) por protozoários do gênero *Leishmania*. A forma cutânea da leishmaniose já havia sido descrita no primeiro século da era cristã, com os relatos de feridas na pele que recebiam o nome de acordo com a região onde ocorriam: botão de Bagdá no Iraque, botão de Aleppo na Síria e ferida de Balkh no Afeganistão (SILVA, 2003).

Na América, a doença é conhecida desde a época pré-colombiana (400 a 900 d. C.), através de cerâmicas peruanas e equatorianas, que documentam em potes Mochica e Huaco, faces humanas com mutilações do nariz e dos lábios, semelhantes às provocadas pela leishmaniose cutâneo-mucosa (BRÜCKER e GENTILINI, 1987).

No Brasil, a leishmaniose foi conhecida quando Cerqueira em 1855, identificou lesões de pele semelhantes ao “botão-do-Oriente”. A partir de 1908 durante a construção da Estrada de Ferro do Noroeste do Brasil, em São Paulo, ocorreram numerosos casos, principalmente na cidade de Bauru, originando-se daí o nome “úlceras-de-Bauru”. Lindenbergh, Carini e Paranhos, em 1909, relataram a presença das leishmanioses furunculoses e de úlceras crônicas em uma população residente em Baúru, Estado de São Paulo, e ainda identificaram o parasita causador dessas lesões (TERRA, 1913).

A *Leishmania* é um parasito que apresenta de um flagelo, localizado em uma depressão da membrana plasmática, rica em DNA, o cinetoplasto. Dos nove gêneros da família Trypanosomatidae, apenas dois, o *Trypanosoma* e a

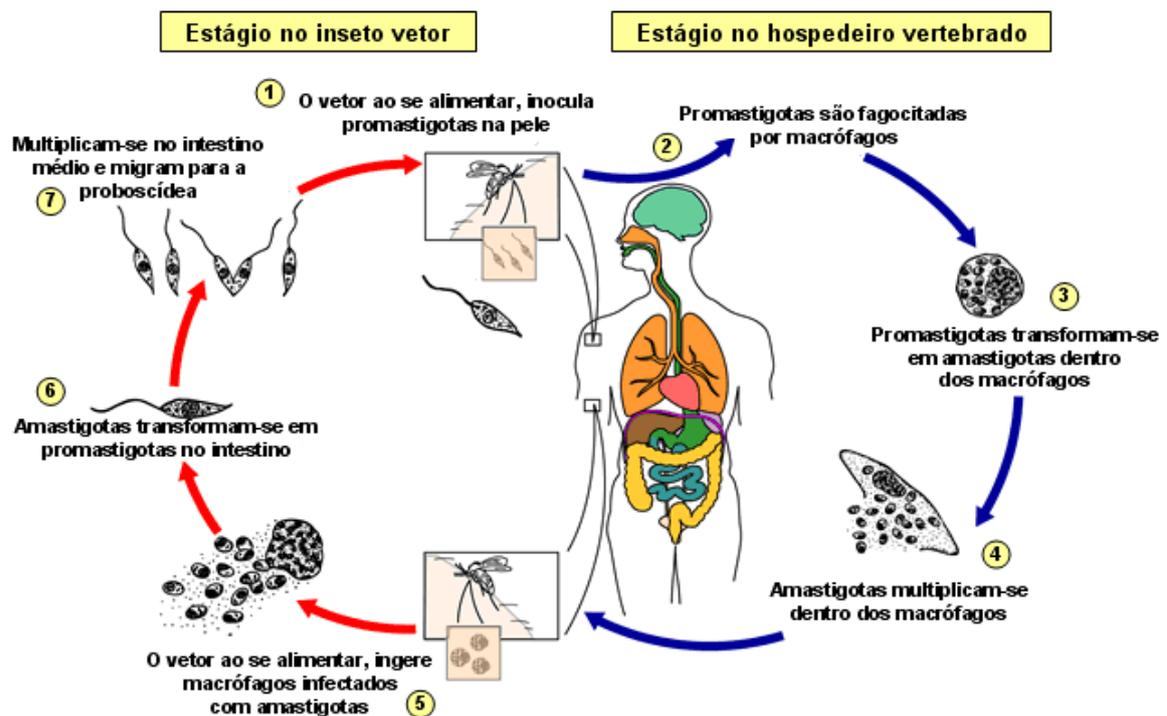
Leishmania, são de interesse médico, sendo o primeiro responsável pela Doença de Chagas (Américas) e pela Doença do sono (África), e o segundo pelas leishmanioses: cutânea, cutânea-mucosa e visceral (SILVA, 2003).

Existem pelo menos sete espécies de *Leishmania* descritas e que estão associadas com a doença humana, sendo que no Brasil *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* são as espécies mais amplamente distribuídas. A severidade da doença varia da forma cutânea benigna e de cura espontânea até formas severas, muitas vezes mutilantes, como a leishmaniose mucocutânea (DORVAL et al., 2006).

As leishmanioses são um problema de saúde de todo o mundo, onde 12 milhões de pessoas estão infectadas nas zonas tropicais e subtropicais de cinco continentes (DESJEUX, 2003). Cerca de 350 milhões de pessoas vivem em áreas de ativa transmissão de *Leishmania* (DESJEUX, 2003), tendo em vista o registro de aproximadamente dois milhões de novos casos por ano no mundo (OMS/2007).

Os parasitos causadores desta protozoose apresentam-se na forma promastigota, quando estão infectando o hospedeiro vertebrado, e na forma amastigota, quando são inoculados pelo inseto vetor. A transmissão da doença para o homem ocorre quando o flebotomíneo - fêmea promove seu repasto sangüíneo (enquanto o inseto vetor suga o sangue do hospedeiro vertebrado, ele transfere promastigotas metacíclicas); estas formas tendem a infectar células do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro vertebrado (principalmente macrófagos) e quando se encontram no interior do macrófago, as promastigotas se transformam em amastigotas, que se multiplicam, levando ao rompimento desta célula hospedeira. A lise leva à liberação de grande quantidade de parasitas, que infectam outros macrófagos. A infecção gera lesões, sendo a forma visceral a mais grave e fatal desta protozoose (SOARES-BEZERRA et al., 2004).

O curso da infecção nos hospedeiros vertebrados, incluindo o homem, é bastante variável e dependendo da espécie do parasito, esta poderá ficar restrita à pele ou visceralizar, tornando-se sistêmica. A contaminação do vetor se dá através da eventual ingestão de macrófagos infectados, por fêmeas de flebótomos, durante seu repasto sanguíneo no vertebrado (SILVA, 2003) (Figura 1).



<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>

Figura 1: Ciclo biológico da leishmania nos hospedeiros vertebrado e invertebrado.

A resposta imune adquirida do hospedeiro contra a leishmaniose é mediada pela resposta do tipo celular, já que o parasito escapa da resposta humoral por residir dentro do macrófago (CUNNINGHAM, 2002).

Os mecanismos para diferenciação de linfócitos T CD4+ em tipos Th1 ou Th2 após a infecção com leishmania ainda não estão totalmente esclarecidos, mas vários fatores têm sido implicados, como pacientes desnutridos (PEARSON e SOUSA, 1996) infectados com HIV (PAREDES et. al. 2003). Há também, os que relatam condições de predisposição à doença, como no caso de pacientes portadores de câncer, em transplantados ou com doenças auto-imunes (SOARES-BEZERRA et al., 2004).

Os linfócitos Th1, secretam citocinas como interleucina 2, interferon gama e fator de necrose tumoral alfa, as quais ativam os macrófagos imaturos e infectados (THEODOS et al., 1991), estimulando a produção da enzima óxido nítrico sintetase induzida (iNOS), que resulta na produção de óxido nítrico

(NO), molécula envolvida na resposta imune contra *Leishmania* (KANE e MOSSER, 2000).

O parasita sobrevive dentro do macrófago mediante a habilidade de inibir a expressão ou atividade da iNOS através da inibição da produção de citocinas envolvidas na regulação da iNOS, inibição da síntese de NO por glicosilinositol fosfolípidios (GIPL) da superfície de amastigotas ou estímulo à produção do fator de transformação do crescimento TGF- β (AEDO, 2007).

O controle das leishmanioses está baseado em medidas profiláticas de combate ao vetor e no extermínio de cães infectados, que são reservatórios de parasitos em áreas peridomiciliares, bem como no tratamento dos indivíduos infectados com os fármacos disponíveis no mercado mundial (SOARES-BEZERRA et al., 2004).

Na ausência de uma vacina eficaz, há uma necessidade urgente de novos medicamentos alternativos capazes de substituir e ou completar o tratamento atual. Este tratamento consiste, como primeira escolha, da administração de antimoniais pentavalentes (CROFT e COOMBS, 2003). Contudo, a toxicidade destes agentes e a persistência dos seus efeitos colaterais, mesmo após modificação de dose e duração do tratamento, são graves inconvenientes. Esses fatos levam a necessidade da busca por novos agentes terapêuticos (BALANA et al., 1998; CARVALHO et al., 2000).

Drogas alternativas como anfotericina B e pentamidinas também têm efeitos colaterais desagradáveis. Por outro lado, extratos vegetais ou compostos de origem vegetal são promissores em proporcionar uma valiosa fonte de novos medicamentos (CARVALHO e FERREIRA, 2001; KAYSER e KIDERLEN, 2001). As plantas vêm sendo bastante utilizadas na medicina popular há muitos anos para tratar doenças parasitárias. Atualmente, elas têm recebido uma atenção especial na procura de novas terapêuticas contra leishmaniose (KAISER et al., 2003).

Neste sentido várias plantas, produtos naturais e compostos isolados já foram estudados até o momento para o tratamento da leishmaniose e apresentaram-se ativos. O número de constituintes químicos relatados com atividade leishmanicida é muito grande, e seria difícil relacioná-los; no entanto, essas substâncias podem ser agrupadas em classes ou funções (Quadro 1). A própria própolis oriunda de outros Estados, e alguns de seus compostos foram

estudados anteriormente e apresentaram-se ativos (ROCHA et al., 2005; MACHADO et al., 2007).

Quadro 1: Classes químicas de compostos com atividade leishmanicida e respectivas referências.

| CLASSE | REFERÊNCIAS |
|----------------------|--|
| Alcalóides | Hiraoka et al., 1986; Mahiou et al., 1994; Lavaud et al., 1995; Fournet et al., 1996; Queiroz et al., 1996; Bringman et al., 2000; Staerk et al., 2000; Carvalho e Ferreira, 2001; Delorenzi et al., 2000; Ferreira et al., 2002 |
| Aminoglicoesteróides | Kam et al., 1997 |
| Aminoesteróides | Kam et al., 1997 |
| Carboidratos | Seneca et al., 1948; Cook et al., 1980 |
| Chalconas | Chen et al., 1993; Boeck et al., 2006 |
| Cumarinas | Bravo et al., 1999 |
| Esteróides | Moretti et al., 1998 |
| Fenilpropanóides | Emam et al., 1995 |
| Flavonóides | Chen et al., 1993; Christensen et al., 1994; Araújo et al., 1998; Kayser et al., 1999; Torres-Santos et al., 1999; Mittra et al., 2000; Morales et al., 2000; Williams et al., 2003 |
| Iridóides | Tandon et al., 1991; Mittal et al., 1998 |
| Lactonas | Ghosh, 1963; Chance, 1995; Waechter et al., 1997; Waechter et al., 1998; Frevier et al., 1999; Carvalho e Ferreira, 2001 |
| Lignananas | Frevier et al., 1999; Barata et al., 2000; Royo et al., 2003 |
| Lipídios | Cunningham et al., 1972; Compagnone et al., 1998; Rasmussen et al., 2000 |
| Quinonas | Hazra et al., 1995; Mahiou et al., 1996; Sittie et al., 1999; Camacho et al., 2000; Kayser et al., 2000; Kaur et al., 2006; Romero et al., 2007 |
| Saponinas | Plock et al., 2001 |
| Terpenóides | Savornin et al., 1991; Koshimizu et al., 1994; Emam et al., 1996; Sauvain et al., 1996; Inchausti et al., 1997; Camacho et al., 2000; Morales et al., 2000; Berger et al., 2001; Kayser et al., 2001; González et al., 2004 |

2. OBJETIVOS

2.1. Geral:

- Avaliar as atividades: anti-leishmania, citotóxica e ativadora de óxido nítrico de amostras de pólen de abelhas sem ferrão e de própolis marrom e própolis vermelha produzidas por abelhas da espécie *Apis mellifera*.

2.2. Específicos:

- Avaliar a atividade de amostras de pólen e de própolis sobre formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*;
- Avaliar a atividade de amostras de pólen e de própolis sobre formas amastigotas de *Leishmania amazonensis* internalizadas em macrófagos;
- Avaliar a atividade citotóxica de amostras de pólen e de própolis sobre macrófagos;
- Avaliar a indução da síntese de óxido nítrico por macrófago na presença de pólen e própolis.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Drogas, reagentes e meios de cultivo celular:

Estreptomicina (10 mg) (Sigma)
Penicilina (10.000 U) (Sigma)
Acetato de etila padrão analítico (Vetec)
Diclorometano padrão analítico (Merck)
Etanol padrão analítico (Vetec)
Hexano padrão analítico (Synth)
Meio de Schneider's (Sigma)
Meio RPMI1640 (Sigma)

3.2. Equipamentos:

Evaporador rotativo (Heidolph, modelo Laborota 4000);
Bomba de vácuo (Fabbe, modelo 141 e Primar, modelo e 34);
Liofilizador (Micro módulo Edwards acoplado a bomba de alto vácuo valPump VLP80 Salvant);
Ultrassom (Marconi, modelo Cleanner Thournton);
Balanças Analíticas (Marconi, modelo Kern 410 e Digimed KN5000L);
Refrigerador (Brastemp, modelo Zyrium Frostfree 430);
Centrífuga (Sigma, modelo 4k15);
Microcentrifuga (Sigma, modelo 2k15);
Estufa de demanda biológica de Oxigênio (Quimis, modelo Q-315M);
Estufa de CO₂ (Marca VWR);
Capela de fluxo laminar (Labconco);
Microscópio óptico binocular (Olympus, modelo CX40);
Microscópio óptico binocular invertido (Quimis, modelo Q730i);
Leitora de placa (Biotek, modelo EL800).

3.3. Coleta e obtenção dos extratos de pólen e própolis

3.3.1. Coleta das amostras:

A amostra de pólen da abelha sem ferrão, *Scaptotrigona* sp, foi coletada em julho de 2007, no município de Monsenhor Gil (PI), distante 43 Km da Capital, situado na mesorregião do Centro-Norte Piauiense, localizado a uma latitude de 05°33'51"S e a uma longitude de 42°36'28"W, estando a uma altitude de 116 metros.

A amostra de própolis, neste trabalho denominada de própolis marrom, foi coletada em agosto de 2008, na cidade de Pio IX (PI), clima semi-árido, distando 444 Km da Capital, situado na mesorregião do Sudeste Piauiense, localizado a uma latitude de 06°50'15"S e a uma longitude de 40°34'45"W, estando a uma altitude de 495 metros.

A amostra de própolis vermelha foi coletada em outubro de 2007, em uma área de restinga, no Distrito de Atapuz, próximo à cidade de Itapissuma, Estado de Pernambuco, localizado a uma latitude de 7°35'44" S e uma longitude: 34°53'30" W.

Todas as amostras foram acondicionadas em recipiente apropriado, hermeticamente fechados, e conservadas sob refrigeração entre -10 e -5 °C.

3.3.2. Obtenção dos extratos:

Os extratos hidroalcoólicos da própolis e pólen foram preparados, respectivamente, com cerca de 100 g da própolis marrom, 5 g da própolis vermelha e 10 g de pólen. As amostras da própolis foram cortadas em pequenos pedaços e a amostra de pólen foi triturada. O material, de cada amostra foi extraído por maceração em etanol/água (v/v) (80:20) à temperatura ambiente, durante 3 dias, sendo sonicado por 30 minutos a cada dia, e após esse período, filtrados para separação do resíduo e sobrenadante. Com o resíduo, repetiu-se o procedimento de extração, mais duas vezes. O

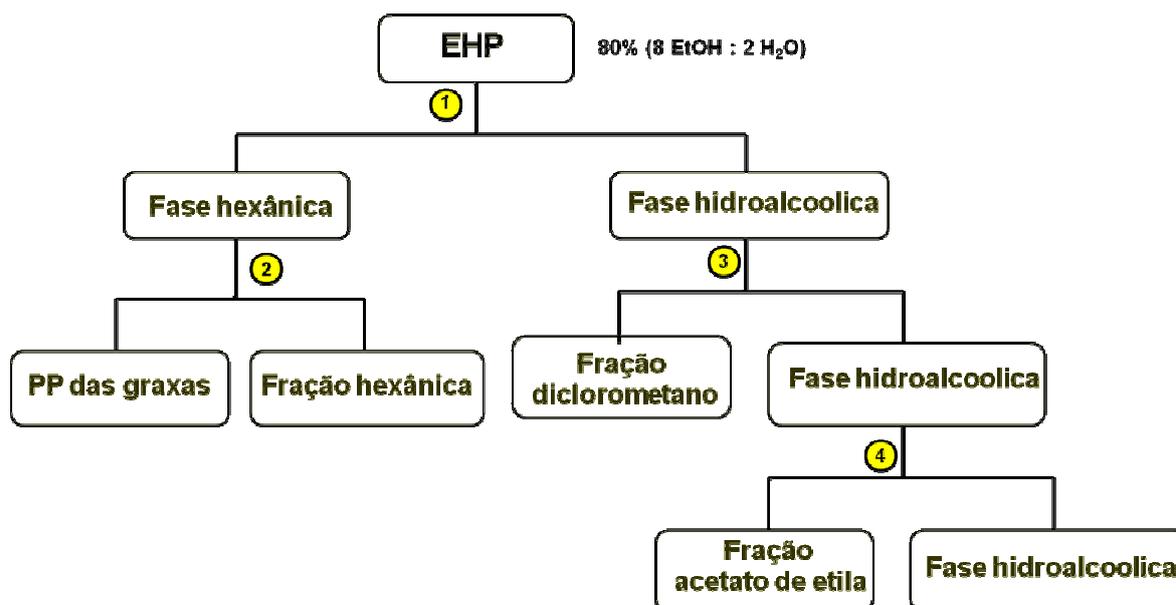
sobrenadante, obtido das três extrações, foi filtrado e posteriormente o solvente foi eliminado em evaporador rotativo e em seguida liofilizado.

3.3.3. Fracionamento do extrato da amostra de própolis marrom:

O extrato hidroalcoólico da própolis (EHP) foi liofilizado e suspenso em metanol/água (v/v), proporção de 9:1, e extraído com Hexano. A fase hexânica foi suspensa em metanol quente e submetida a refrigeração para precipitação das graxas, que foram eliminadas por filtração. O solvente foi eliminado por evaporação à pressão reduzida, rendendo a fração hexânica.

À fase hidroalcoólica foi adicionada mais água até a proporção metanol/água (v/v) de 1:2. A mistura resultante foi extraída com diclorometano (CH_2Cl_2) e, em seguida, com acetato de etila (AcOEt), rendendo após a eliminação dos solventes, as frações diclorometano e acetato de etila, respectivamente (SILVA et al., 2005 e 2008). O esquema, apresentado no fluxograma 3, ilustra o procedimento de fracionamento.

Desse fracionamento, originaram-se as frações PM – Acetato de Etila, PM – Diclorometano e PM – Hexânica, não tendo o mesmo ocorrido com a própolis vermelha pela pouca quantidade de amostra disponível, aproximadamente 5 g, e pelo fato desta ser proveniente de outro Estado o que dificultou sua obtenção.



1. Liofilização, MeOH: H₂O (9:1) e Extração c\ Hexano
2. Suspensão em MeOH quente, filtração e eliminação do solvente
3. Extração c\ Diclorometano e eliminação do solvente
4. Extração c\ Acetato de Etila e eliminação do solvente

Fluxograma 3: Fracionamento da própolis marrom a partir do extrato hidroalcolólico, para obtenção das frações hexânica, diclorometano e acetato de etila.

3.4. Animais

Para o desenvolvimento do trabalho foram utilizados camundongos Swiss, 5 a 8 semanas de vida, machos, com peso variando de 20 a 25 g, provenientes do biotério do Núcleo de Pesquisas em Plantas Mediciniais (NPPM) da Universidade Federal do Piauí.

Os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro de 12 horas e com livre acesso a água e comida.

A utilização dos animais e os procedimentos adotados para com os mesmos foram aprovados pelo comitê de ética, processo número 036/09.

3.5. Parasitos e células

Foram utilizados parasitos da espécie *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, cepa LTB0016, gentilmente cedida pela Dra. Regina Bressan Figueiredo do Instituto Ageu Magalhães – Fiocruz, Recife (PE), e mantida em sucessivas passagens em animais de biotério (camundongos) e após respectivo isolamento, cultivada em meios de Schneider's (Sigma - USA) acrescido de 10% de soro fetal bovino (Sigma - USA), penicilina (10.000 U) e estreptomicina (10 mg) (Sigma – USA).

Foram utilizados macrófagos peritoneais residentes isolados de camundongos, de 4 a 5 semanas de vida, provenientes do Núcleo de Pesquisa em Plantas Mediciniais (NPPM/UFPI).

3.6. Avaliação dos extratos sobre formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*

As formas promastigotas em sua fase logarítmica de crescimento foram distribuídas em placas de 96 poços para cultivo celular, na quantidade de 1×10^6 leishmania por poço. Em seguida, os respectivos extratos e suas frações foram adicionados aos poços, em diluições seriadas na escala de 1:2. As placas foram incubadas em estufa de demanda biológica de oxigênio (B.O.D.) a temperatura de 26°C e observadas por 24, 48 e 72 horas para o acompanhamento do respectivo crescimento e da viabilidade das leishmanias.

3.7. Avaliação da citotoxicidade

3.7.1. Obtenção dos macrófagos:

Os macrófagos foram obtidos da cavidade abdominal de camundongos Swiss. Para tal, os animais foram anestesiados com injeção intramuscular de 2 mg/Kg de peso vivo de cloridrato de xilazina e 15 mg/Kg de peso vivo de cloridrato de cetamina e, após, eutanásia por deslocamento cervical.

Em seguida, foi feita a antissepsia da pele utilizando álcool a 70° e levados para a capela de fluxo laminar, onde foram fixados em placa de isopor na posição de decúbito dorsal.

A retirada de macrófagos foi feita administrando-se na cavidade abdominal cerca de 8,0 mL de tampão fosfato salino (PBS), pH 7,4, estéril, a 4 °C. Após, foi feita uma massagem suave na região abdominal e, em seguida, introduziu-se uma agulha acoplada a uma seringa estéril para aspiração do exsudado (Figura 2).



SANTANA, L. C. L. R, 2009. Fotografia digital.

Figura 2: Coleta de macrófagos residentes da cavidade peritoneal de camundongos. A: retirada da pele do animal; B: administração de PBS no peritônio e C: aspiração do exsudado peritoneal contendo as células.

Em seguida, o material foi transferido para tubo cônico estéril, centrifugado a 4 °C e a 1000 rpm por 10 minutos, lavado três vezes com PBS estéril, sempre mantido a temperatura de 4 °C. A quantidade de macrófagos foi estimada por contagem das células em câmara de Neubauer coradas com azul de Trypan para análise da viabilidade celular.

3.7.2. Avaliação da Citotoxicidade pelo MTT:

Avaliou-se a citotoxicidade dos extratos e frações utilizando o Teste do MTT. Neste teste avalia-se a capacidade metabólica das mitocôndrias através da reação de clivagem redutiva do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazolil]-2,5-difeniltetrazólio), aparentemente muito simples, mas de mecanismo muito

complexo, originando o formazan. Esse composto é solubilizado e quantificado utilizando-se espectrofotômetro com leitura a 550 nm (Figura 3).

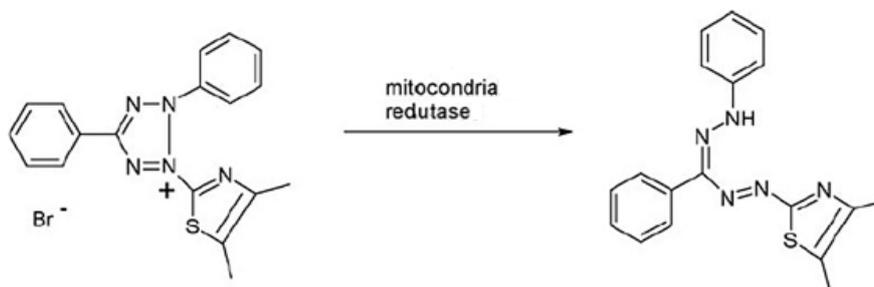


Figura 3: Reação de redução do MTT para formazan

(http://www.biocompare.com/images/bc/006/ArticleImages/71785_Ap_No_Cell_3.jpg)

Seguiu-se o protocolo descrito por Nogueira et al. (2007). Em placa de 96 poços foram adicionados 100 μ L de meio RPMI 1640 completo (contendo 10% de soro fetal bovino, 10.000 U de penicilina e 10 mg de estreptomicina). Em seguida, adicionou-se cerca de 2×10^5 macrófagos por poço e incubou-se por 4 horas para adesão das células à placa. Após esse tempo, foram feitas duas lavagens com meio RPMI completo para retirada das células que não aderiram. Posteriormente, foram adicionados os extratos e suas frações, em triplicatas, previamente diluídos para um volume final de 100 μ L para cada poço nas concentrações de 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 μ g/mL. Em seguida incubou-se por 48 horas e, após, adicionou-se 10 μ L de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazolil]-2,5-difeniltetrazólio) diluído em PBS a uma concentração de 5 mg/mL (10% do volume; isto é, 10 μ L para cada 100 μ L de meio) e incubou-se por 4 horas em estufa 37 °C com 5% de CO₂. Ao final, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 100 μ L de DMSO (dimetilsulfóxido) em todos os poços, inclusive no branco. Colocou-se a placa sob agitação por cerca de 30 minutos à temperatura ambiente para dissolução completa do formazan. Por último, fez-se a leitura a 550 nm em leitora de placa (Figura 4).



SANTANA, L. C. L. R, 2009. Fotografia digital.

Figura 4: Leitora de placa contendo a placa para avaliação da citotoxicidade.

3.8. Avaliação dos extratos sobre formas amastigotas de *Leishmania amazonensis*.

Macrófagos foram cultivados em placas de 24 poços numa concentração de 2×10^5 células por poço, contendo uma lamínula de 13 mm de diâmetro e 500 μ L de meio RPMI 1640 completo. Após 4 horas de incubação em estufa a 37 °C com 5% de CO₂ para adesão, os macrófagos foram infectados com promastigotas em fase estacionária de crescimento na proporção de 10 promastigotas por macrófago (10:1) e incubados por 18 horas em estufa a 37 °C com 5% de CO₂. Posteriormente, os extratos e suas frações foram adicionados aos poços, em triplicatas, nas concentrações 12,5; 6,25 e 3,125 μ g/mL e incubados por 48 horas. Em seguida, as lamínulas foram coradas pelo corante hematológico “panótico” e avaliou-se a proporção de macrófagos infectados e a relação do número de formas amastigotas por macrófagos. Foram contados cerca de 100 macrófagos infectados por lamínula, segundo SOARES et al. (2007).

3.9. Preparação de culturas de macrófagos para quantificação de óxido nítrico.

3.9.1. Dosagem colorimétrica de nitrito:

Em placa de 96 poços foram adicionados 2×10^5 macrófagos por poço. Incubou-se em estufa a 37 °C com 5% de CO₂, por 4 horas, para adesão. Adicionou-se os extratos ou suas frações, previamente diluídos em meio de cultura contendo as diferentes concentrações (25; 12,5; 6,25 e 3,12 µg/mL), e incubou-se novamente em estufa a 37 °C e a 5% de CO₂, por 24 horas. Após esse período, o sobrenadante do cultivo celular foi coletado e transferido para outra placa para a dosagem de nitrito.

A curva-padrão foi feita com nitrito de sódio 150 µM em água de Milli-Q a concentrações variadas de 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100 e 150 µM diluídos em meio de cultura. Na hora da dosagem misturou-se partes iguais da amostra ou das soluções preparadas para obtenção da curva-padrão com o mesmo volume do reagente de Griess - 1% Sulfanilamida em H₃PO₄ 10% (v:v) em água Milli-Q, adicionados em partes iguais a 0,1% Naftilenodiamino em água Milli-Q e fez-se a análise na leitora de placa a 550 nm (SOARES et al., 2007).

3.10. Eutanásia dos animais utilizados nos protocolos

Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, previamente anestesiados, com injeção intramuscular de 0,01 mL de cloridrato de xilazina e 0,03 mL de cloridrato de cetamina, de acordo com a RESOLUÇÃO N^o 714, DE 20 DE JUNHO DE 2002, CRMV, sendo as eutanásias realizadas sob a responsabilidade do Prof. Dr. Fernando Aécio de A. Carvalho, CFMV-PI N^o 0335.

3.11. Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente aplicando-se a regressão de probitos e teste “t” de *Student* para amostras independentes usando o programa SPSS versão 13.0. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Avaliação dos extratos e frações sobre formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*

Avaliou-se o efeito dos extratos hidroalcoólicos de pólen, própolis vermelha (PV) e própolis marrom (PM) e frações desta última sobre formas promastigotas de *L. amazonensis* observando a inibição do crescimento para os tempos de 24, 48 e 72 horas de incubação.

Os resultados mostraram que ocorreu inibição do crescimento das leishmania para todos os extratos e frações utilizadas, com exceção do extrato hidroalcoólico do pólen, evidenciando-se maior atividade para concentrações acima de 100 µg/mL e para 72 horas de incubação.

Das frações utilizadas, a PM - Diclorometano apresentou melhor resultado de inibição, pois em concentrações menores e para todos os tempos observados esta fração inibiu, em média, 50% do crescimento (Figura 5). Resultados semelhantes foram obtidos para as frações PM – Hidroalcoólico (Figura 6) e PV – Hidroalcoólico (Figura 7), tendo esta última uma inibição de 100 % a partir da concentração de 25 µg/mL para as 72 horas de incubação.

As frações PM – Acetato de Etila (Figura 8) e PM – Hexânica (Figura 9) apresentaram resultados inferiores, tendo a fração PM – Hexânica se mostrado superior a PM – Acetato de Etila, pois as 72 horas de incubação conseguiu inibir 100% do crescimento das leishmanias a partir da concentração de 100 µg/mL.

A partir destes resultados, calculou-se a concentração inibitória média (CI₅₀) dos extratos para os mesmos tempos observados.

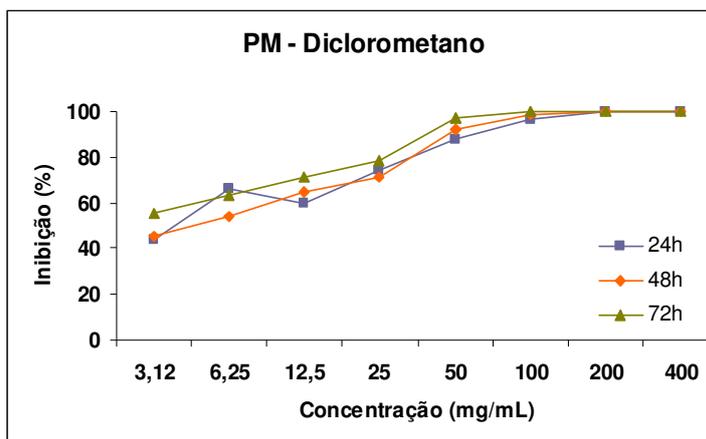


Figura 5: Inibição *in vitro* das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* pela fração PM - Diclorometano da própolis marrom, para os tempos de 24, 48 e 72 horas de incubação.

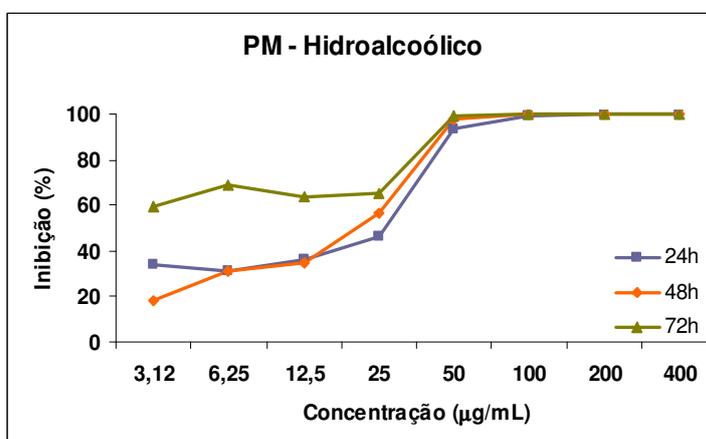


Figura 6: Inibição *in vitro* das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* pelo extrato PM - Hidroalcoólico da própolis marrom, para os tempos de 24, 48 e 72 horas de incubação.

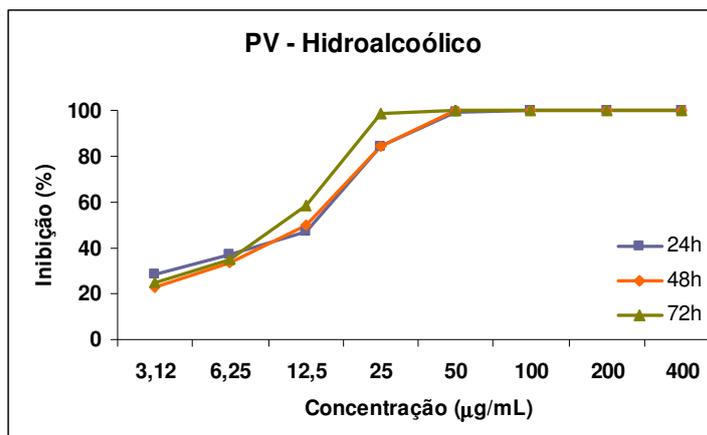


Figura 7: Inibição *in vitro* das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* pelo extrato PV - Hidroalcoólico da própolis vermelha, para os tempos de 24, 48 e 72 horas de incubação.

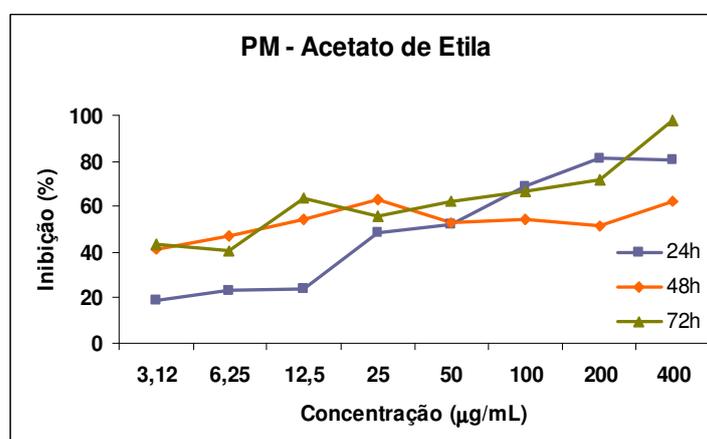


Figura 8: Inibição *in vitro* das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* pela fração PM – Acetato de Etila da própolis marrom, para os tempos de 24, 48 e 72 horas de incubação.

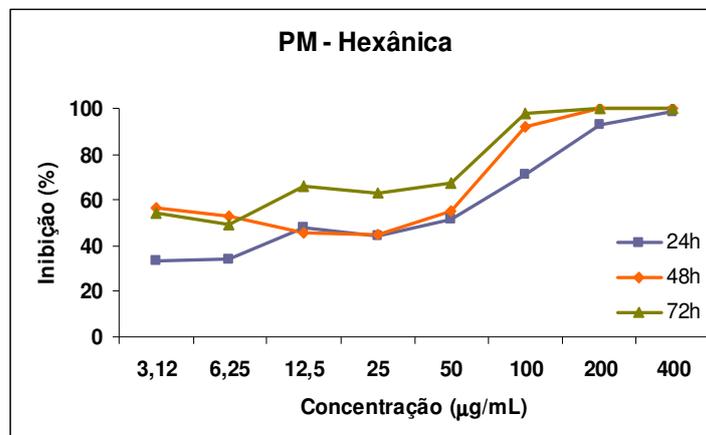


Figura 9: Inibição *in vitro* das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* pela fração PM – Hexânica da própolis marrom, para os tempos de 24, 48 e 72 horas de incubação.

Podemos verificar que das cinco frações avaliadas, a PM - Diclorometano apresentou os menores valores de CI_{50} , ou seja: 4,96 (24 h); 4,95 (48 h) e 3,22 (72 h), seguidos dos extratos PM - Hidroalcoólico e da PM - Hexânica que apresentaram valores muito próximos com 11,87 e 17,34 (24 h); 12,08 e 10,11 (48 h) e 4,64 e 4,79 (72 h) respectivamente, e do PV - Hidroalcoólico com 8,60 (24 h); 10,74 (48 h) e 7,24 (72 h). Tendo a fração PM - Acetato de Etila apresentado os maiores valores de CI_{50} (Tabela 1, 2 e 3).

Tabela 1: Concentração em $\mu\text{g/mL}$ capaz de inibir 50% das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (CI_{50}) em 24 horas

| Extrato/Fração | CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) 24 horas | Intervalo de confiança de 95% ($\mu\text{g/mL}$) |
|---------------------|--|---|
| PM Acetato de Etila | 36,95 | 10,45 - 132,95 |
| PM Diclorometano | 4,96 | 2,75 – 8,00 |
| PM Hexânica | 17,34 | 6,58 – 40,28 |
| PM Hidroalcoólico | 11,87 | 6,65 – 20,17 |
| PV Hidroalcoólico | 8,60 | 6,01 – 12,07 |

PM = própolis marrom; PV = própolis vermelha

Tabela 2: Concentração em $\mu\text{g/mL}$ capaz de inibir 50% das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (CI_{50}) em 48 horas

| Extrato/Fração | CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) 48 horas | Intervalo de confiança de 95% ($\mu\text{g/mL}$) |
|---------------------|--|---|
| PM Acetato de Etila | 28,17 | 7,70 – 93,41 |
| PM Diclorometano | 4,95 | 2,75 – 7,97 |
| PM Hexânica | 10,11 | 3,46 – 23,58 |
| PM Hidroalcoólico | 12,08 | 6,69 – 20,71 |
| PV Hidroalcoólico | 10,74 | 7,59 – 15,06 |

PM = própolis marrom; PV = própolis vermelha

Tabela 3: Concentração em $\mu\text{g/mL}$ capaz de inibir 50% das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (CI_{50}) em 72 horas

| Extrato/Fração | CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) 72 horas | Intervalo de confiança de 95% ($\mu\text{g/mL}$) |
|---------------------|--|---|
| PM Acetato de Etila | 8,83 | 1,60 – 28,05 |
| PM Diclorometano | 3,22 | 1,66 – 5,43 |
| PM Hexânica | 4,79 | 1,31 – 12,00 |
| PM Hidroalcoólico | 4,64 | 2,27 – 8,31 |
| PV Hidroalcoólico | 7,24 | 4,97 – 10,30 |

PM = própolis marrom; PV = própolis vermelha

Os resultados obtidos mostram que todas as frações avaliadas apresentaram valores de CI_{50} decrescentes em função do tempo de incubação, tendo a fração PM - Acetato de Etila apresentado maior índice de redução de CI_{50} (76,10%), variando de 36,95 em 24 h para 8,83 com 72 h de incubação, seguida da fração PM - Hexânica com redução de 72,37% para o mesmo intervalo de tempo.

4.2. Avaliação da citotoxicidade

A citotoxicidade dos extratos e frações testados foi analisada pelo cálculo da concentração citotóxica média (CC_{50}).

Analisando os resultados obtidos e apresentados na Tabela 4, podemos observar que o extrato PV - Hidroalcoólico apresentou o mesmo valor de CC_{50} com 21,70 que o extrato PM - Hidroalcoólico com 21,69; fração PM - Diclorometano com 30,50 e fração PM - Hexânica com 35,10. Para a fração PM - Acetato de Etila nas concentrações testadas não foi possível determinar a CC_{50} .

Tabela 4: Concentração em $\mu\text{g/mL}$ dos extratos hidroalcoólicos da própolis vermelha (PV) e da própolis marrom (PM) e das frações da própolis marrom capaz de reduzir 50% da viabilidade dos macrófagos (CC_{50}) em 48 horas.

| Extrato/Fração | CC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) | Intervalo de confiança de 95% ($\mu\text{g/mL}$) |
|---------------------|--------------------------------|--|
| PM Acetato de Etila | * | * |
| PM Diclorometano | 30,50 | 10,94 – 49,81 |
| PM Hexânica | 35,10 | 27,04 - 45,10 |
| PM Hidroalcoólico | 21,69 | 16,65 – 28,66 |
| PV Hidroalcoólico | 21,70 | 15,11 – 28,56 |

* Não foi possível determinar.

Após a determinação da CI_{50} e CC_{50} para cada extrato e fração, calculou-se o índice de seletividade para avaliar a segurança dos mesmos na utilização contra a leishmaniose (Tabela 5). Esse índice representa a relação entre a CI_{50} e a CC_{50} .

A tabela 5 mostra que a fração PM - Diclorometano é a mais segura apresentando o maior índice de seletividade dos extratos e frações testadas, com índice de 6,16, seguida da a fração PM - Hexânica com 3,47 e os extratos PM - Hidroalcoólico e PV - Hidroalcoólico com valores muito próximos de 1,80 para o primeiro e 2,02 para o segundo. Como não foi possível calcular a CC_{50} da fração PM - Acetato de Etila, conseqüentemente não foi permitido calcular seu índice de seletividade.

Tabela 5: Relação entre a toxicidade do extrato para o parasito e a toxicidade dos extratos hidroalcoólicos de própolis vermelha (PV) e própolis marrom (PM) ou frações da PM para as células do hospedeiro (índice de seletividade).

| Extrato/Fração | Índice de seletividade ($\mu\text{g/mL}$) |
|---------------------|--|
| PM Acetato de Etila | * |
| PM Diclorometano | 6,16 |
| PM Hexânica | 3,47 |
| PM Hidroalcoólico | 1,80 |
| PV Hidroalcoólico | 2,02 |

* Não foi possível determinar.

4.3 Avaliação dos extratos sobre formas amastigotas de *Leishmania amazonensis*.

Os resultados obtidos com a infecção de macrófagos peritoniais com promastigotas de *L. amazonensis* e tratados por 48 horas com o extrato PM – Hidroalcoólico e as frações PM - Acetato de Etila e PM - Diclorometano mostram que é significativa a diferença no índice de infecção quando comparamos a quantidade de formas amastigotas presentes no interior dos macrófagos tratados com a quantidade presente no interior dos macrófagos do grupo não tratado (Figura 10).

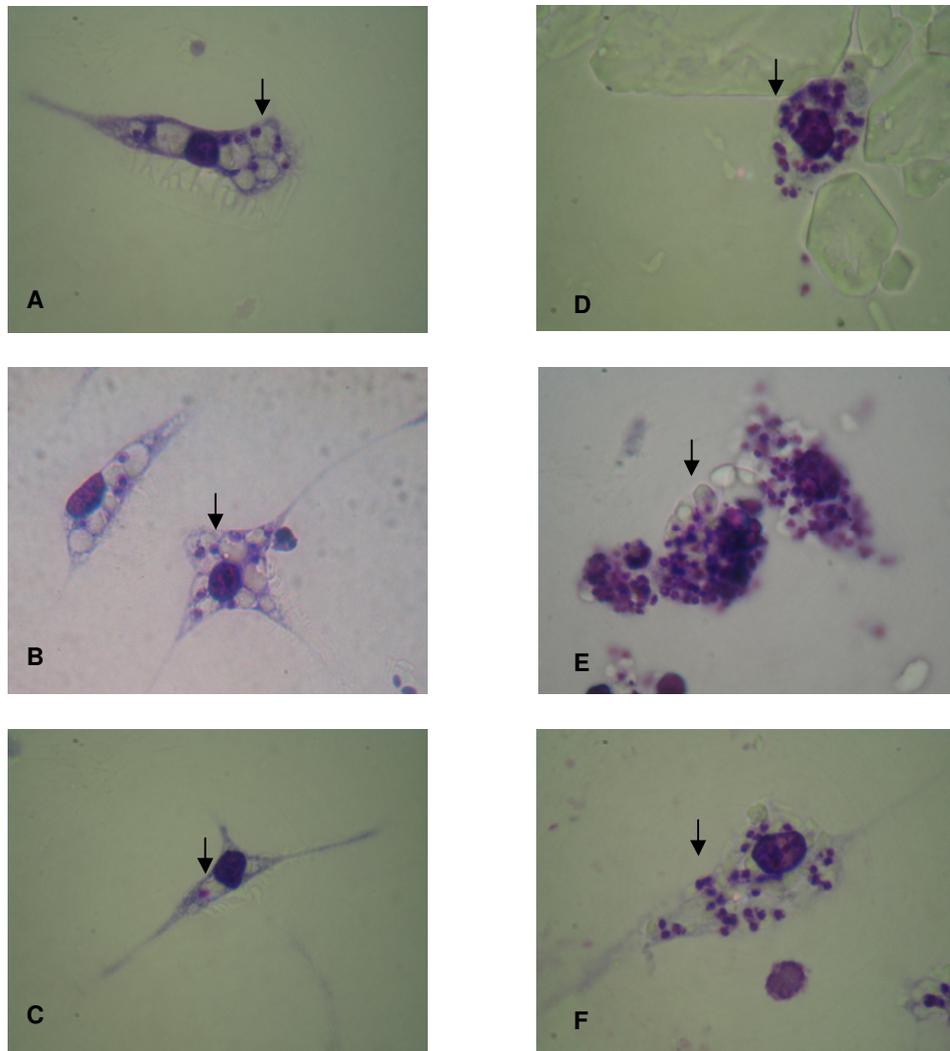
Os macrófagos tratados apresentam um número muito menor de amastigotas (em média cinco amastigotas por macrófago), enquanto no grupo controle encontrou-se um número muito maior (média de 20 amastigotas por macrófago).

Analisando individualmente os resultados, verificamos que a fração PM - Acetato de Etila reduziu significativamente a quantidade de formas amastigotas internalizadas nos macrófagos nas três concentrações avaliadas (3,12; 6,25 e 12,5 µg/mL). Porém, essa redução não foi concentração dependente, pois não apresentou diferença significativa quando comparada entre elas (Figura 11).

Macrófagos tratados com a fração PM - Diclorometano apresentaram redução significativa no número de amastigotas internalizadas quando comparados com macrófagos do grupo controle. Essa diferença também foi evidente entre os grupos tratados com diferentes concentrações, mostrando que para a fração PM – Diclorometano a redução da infecção foi concentração dependente, pois quanto maior a concentração maior a redução do número de amastigotas no interior das células tratadas, sendo esta diferença significativa (Figura 12).

Avaliando os resultados encontrados para o extrato PM – Hidroalcoólico, podemos verificar através da figura 13 que os macrófagos tratados com este extrato apresentaram número reduzido de amastigotas internalizadas quando comparado com os macrófagos do grupo controle. Verificando o efeito das três concentrações utilizadas deste extrato, as

concentrações 6,25 e 12,5 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram uma maior redução do índice de infecção que o encontrado para a concentração de 3,12 $\mu\text{g/mL}$.



SANTANA, L. C. L. R, 2009. Fotografia digital.

Figura 10: Microscopia ótica de cultivo de macrófagos peritoneais (2×10^5 células/poço) infectados com *Leishmania amazonensis* (2×10^6 promastigotas/poço) e incubados com 48 horas a 37°C e a 5% de CO_2 . **A, B e C** correspondem a macrófagos dos grupos tratados com PM – Diclorometano a 12,5 $\mu\text{g/mL}$. **D, E e F** correspondem a macrófagos do grupo controle. Setas indicam formas amastigotas internalizadas. Aumento de 1000x.

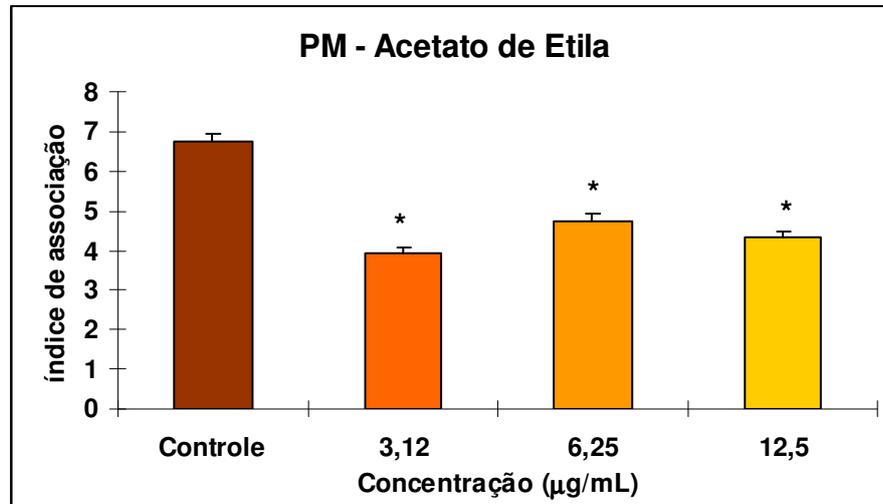


Figura 11: Efeito da fração acetato de etila de própolis marrom sobre a infecção de macrófagos com *L. amazonensis* após tratamento de 48 horas.

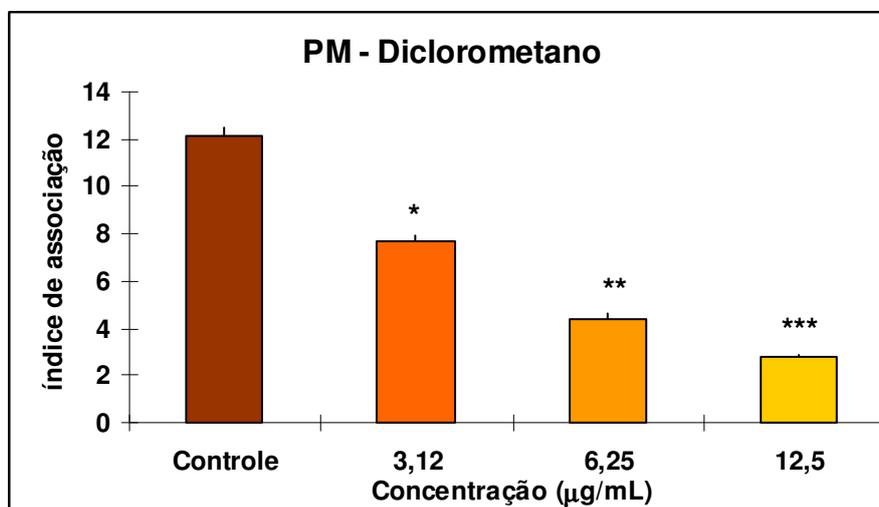


Figura 12: Efeito da fração diclorometano de própolis marrom sobre a infecção de macrófagos com *L. amazonensis* após tratamento de 48 horas.

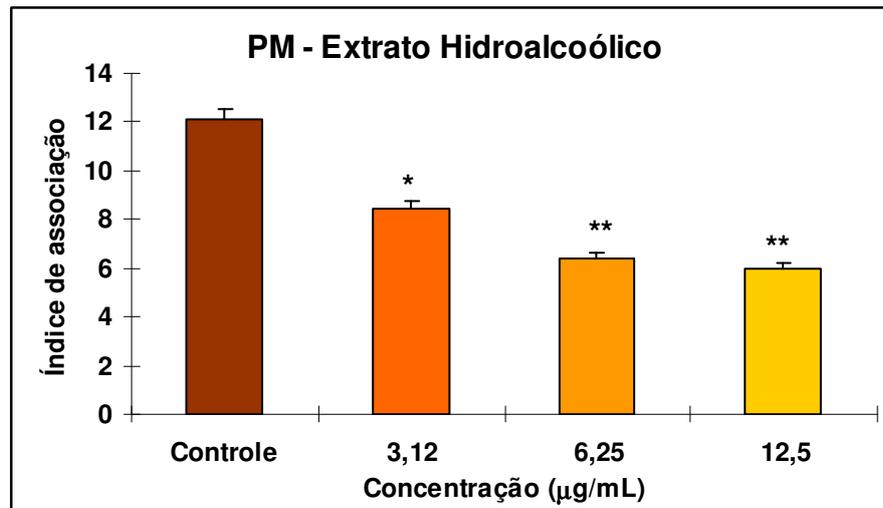
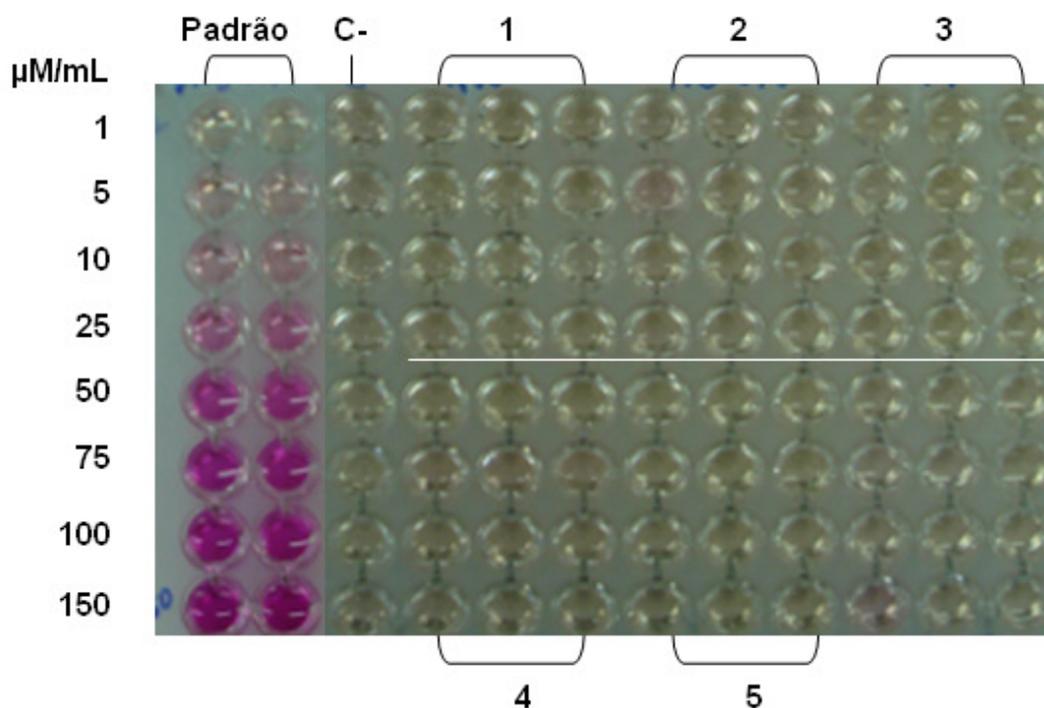


Figura 13: Efeito do extrato hidroalcoólico de própolis marrom sobre a infecção de macrófagos com *L. amazonensis* após tratamento de 48 horas.

4.4. Quantificação de óxido nítrico produzido por dosagem colorimétrica de nitrito.

Analisando os resultados encontrados observamos que não foi detectado nitrito no meio de cultivo contendo os macrófagos com os respectivos extratos e frações incubados por 48 horas.



SANTANA, L. C. L. R, 2009. Fotografia digital.

Padrão (1,0 a 150 μ M/mL de nitrito); (C-) Controle Negativo; (1) PM - Acetato de Etila; (2) PM - Diclorometano; (3) PM - Hexânica; (4) PM - Hidroalcoólico e (5) PV - Hidroalcoólico.

Figura 14: Dosagem colorimétrica de nitrito para avaliação indireta de produção de óxido nítrico por macrófagos (1×10^5 /poço) incubados com diferentes concentrações (25; 12,5; 6,25 e 3,12 μ g/mL) de extratos e suas frações.

5. DISCUSSÃO

Os produtos obtidos da colméia, tais como pólen e própolis são elaborados pelas abelhas a partir de fontes vegetais, por isso, a composição química desses produtos muito se assemelha à composição química das plantas utilizadas por estes insetos como pasto apícola.

Dentre as amostras testadas o pólen não apresentou atividade anti-leishmania. A avaliação da composição química dessa amostra mostrou ser complexa com predominância de açúcares, particularmente na forma de monossacarídeos (LIMA NETO, 2009).

Os extratos hidroalcoólicos das amostras de própolis vermelha e própolis marrom apresentaram significantes e semelhantes atividades anti-leishmania sobre formas promastigotas.

Em estudos realizados com a amostra de própolis vermelha foram identificados 50 constituintes voláteis. Os principais foram: *trans*-anetol, *α*-copaeno, e metil isoeugenol. Sendo o *trans*-anetol o constituinte majoritário, cujo teor foi 52,58% (NUNES et al., 2009). Quanto aos constituintes fixos sililados foram identificados, por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG/EM): açúcares (frutose, glicose, galactose e turanose), triperpenos (β -amirina e cicloartenol) e compostos fenólicos (fluoroglucinol e *p*-hidrofenilacrilato) (DEUS et al., 2008).

Por esses estudos, evidenciou-se grande diversidade na composição química da própolis vermelha, tanto em seus constituintes fixos, quanto em voláteis. Destacando-se o *trans*-anetol que apresenta atividades analgésica, anestésica, antioxidante e antagonista de cálcio (Dr. DUKE, 2010).

Nas análises da anti-leishmania da própolis marrom foram utilizados extrato hidroalcoólico e frações. O fracionamento foi realizado utilizando-se solventes de polaridade crescente. Inicialmente utilizou-se hexano, solvente de baixa polaridade, em seguida diclorometano, de média polaridade e, por último, acetato de etila, de alta polaridade. Na avaliação de fenóis totais nas frações, observou-se, como esperado, maior teor na fração acetato de etila; no entanto, nos testes de promastigotas a fração mais ativa foi a de diclorometano,

justificando não haver uma correlação direta entre a atividade anti-leishmania apresentada pela fração e o seu teor em fenóis total.

Posteriormente a atividade anti-leishmania foi realizado o ensaio de citotoxicidade com o MTT. Ambos, extratos e frações induziram um grande aumento de redução do MTT. Os resultados mostraram que quando os testes foram realizados com a maior concentração utilizada (400 µg/mL) os dados obtidos foram discrepantes (dados não mostrados), esses resultados corroboram com os resultados obtidos por Ayres et al. (2007), quando avaliaram o efeito de própolis brasileira em *Leishmania amazonensis*, utilizando quatro amostras de própolis, sendo: três amostras de própolis verde, duas do Estado do Paraná e uma oriunda do Estado de Minas Gerais, e uma amostra de própolis vermelha do Estado de Alagoas.

Esse resultado aparentemente paradoxal, obtidos para as maiores concentrações dos extratos que apresentaram citotoxicidade inferior a concentrações menores, deve ser devido à presença de constituintes fenólicos nessas amostras, que podem estar interferindo de forma competitiva pelo sítio de ligação à redutase com o MTT e, não somente, a uma redução do MTT efetuada apenas pelos macrófagos.

Os compostos fenólicos apresentam atividade antioxidante comprovada (PIETTA et al., 2002; BLONSKA et al., 2004; KUMAZAWA et al., 2004; TORRES et al., 2008; NUNES et al., 2009), por isso, não é surpreendente que eles interajam com o MTT, promovendo a sua redução, e assim, contribuindo com o aumento do formazan (Figura 3), embora, outras possibilidades de interação dos compostos fenólicos com os macrófagos possam existir (BERNHARD et al., 2003; AYRES et al., 2007).

Quando o teste foi realizado com a concentração de 100 µg/mL, observou-se maior toxicidade para os extratos hidroalcoólicos, tendo os dois extratos PM – hidroalcoólico e PV - hidroalcoólico apresentado igual citotoxicidade. A maior reatividade dos extratos, que das frações, da própolis marrom, sugere um sinergismo entre os diversos constituintes para este teste. E a concentração de 100 µg/mL ainda deve ter sido alta para a fração Acetato

de Etila, que apresenta alta concentração de fenóis totais, por isso não foi possível calcular a CC_{50} desta fração.

Quanto aos testes de atividade anti-leishmania sobre as formas amastigotas internalizadas em macrófagos, os resultados com o extrato e as frações mostraram a mesma ordem de atividade observada para o extrato e as frações da própolis marrom comparado ao teste sobre as formas promastigotas (Tabela 1 a 3 e Figuras 9 a 13).

No extrato hidroalcoólico da amostra de própolis marrom foram identificadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas várias substâncias, como majoritárias: ácido p-cumárico, ácido 3,5-dihidroxibenzóico, β -amirina, germanicol e lupeol e, mais recentemente, por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria massa/massa (CLEMEM) alguns flavonóides glicosilados, dentre os quais rutina e quercetina (CALAND NETO, 2010).

Na literatura (WILLIAMS et al., 2003) existe comprovação de atividade leishmanicida de compostos fenólicos. Porém, em nosso estudo observamos que a ordem da quantidade de fenóis totais não está diretamente relacionada com a atividade anti-leishmania do extrato e das frações da própolis marrom utilizada. Os teores de fenóis totais determinados, em mg da amostra por equivalente de ácido gálico, foram: fração PM - hexânica (53,08); extrato PM - hidroalcoólico (80,12); fração PM - diclorometano (146,90) e fração acetato de etila (405,96) (CALAND NETO, 2010). No entanto, a fração de maior atividade anti-leishmania foi a de média polaridade (diclorometano), seguida do extrato PM - hidroalcoólico que não apresentam os maiores teores de fenóis totais.

Da fração de média polaridade, foram isolados terpenóides (lupeol, β -amirina e acetato de lupeolila), um fenilpropanóide-terpenóide (cinamato de lupeolila) e um composto fenólico (cumarato de alquenila) (SOUSA et al., 2003). Estudos mais aprofundados sobre essas substâncias podem explicar se o responsável pela atividade anti-leishmania dessa fração é um desses compostos majoritários de forma isolada ou um sinergismo entre eles, já que a todos já se atribuiu atividade anti-leishmania (Quadro 1).

Na atividade anti-leishmania uma das vias que pode está envolvida é a via do óxido nítrico, uma vez que os macrófagos infectados com amastigotas de *Leishmania* produzem óxido nítrico (NO) capaz de destruir a forma intracelular do parasito sendo descrita como uma importante via de mecanismo envolvida (CAMPOS et al., 2003).

A abordagem moderna do desenvolvimento racional de drogas baseia-se na identificação de vias metabólicas indispensáveis à sobrevivência do microorganismo. Desta forma, após a seleção de alvos biológicos, o objetivo passa a ser a caracterização detalhada de componentes de vias metabólicas envolvidas, e assim, enzimas-chaves poderão ser exploradas no desenvolvimento de inibidores de reações enzimáticas, sem afetar a célula hospedeira.

Nesse trabalho, esta via de sinalização foi avaliada como alvo da quimioterapia experimental anti-leishmania utilizando o extrato e as frações da Própolis Marrom. Caracterizada pela detecção de nitrito em placas com cultivo de macrófagos. Os resultados obtidos mostraram que o extrato e as frações testados não alteraram o teor de óxido nítrico basal, sugerindo que os mesmos não atuam através desta via para a atividade anti-leishmania.

6. CONCLUSÕES

Os testes *in vitro* realizados para a avaliação de atividade contra formas promastigotas e amastigotas de leishmania, utilizando extratos ou frações de amostras de própolis apresentaram resultados eficientes.

O teste de citotoxicidade utilizando o MTT constitui-se num método simples e eficaz. Contudo, torna-se complexo para amostras que apresentam compostos fenólicos, como observado em amostras avaliadas.

Entre os produtos da colméia testados, a Própolis Vermelha e a Própolis Marrom apresentaram boa atividade tornando-se, portanto, uma fonte potencial para posteriores estudos objetivando o desenvolvimento de produtos apiterápicos com atividade para o tratamento das leishmanioses.

Estudos são necessários para avaliar os constituintes marcadores dessas amostras de própolis para sua caracterização e quantificação.

A determinação das substâncias responsáveis pela atividade anti-leishmania dessas amostras avaliadas necessitam de mais estudos.

A via do óxido nítrico (NO) foi investigada e os resultados indicaram que esta não está envolvida no mecanismo de atuação das amostras de Própolis Vermelha e Própolis Marrom para a atividade anti-leishmania apresentada.

7. REFERÊNCIAS:

AEDO, J. R. N. G. **Atividade de álcool, aldeído e ácido perílico contra L. (L.) major e L. (L.) amazonensis**. 2007. 105f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

ALMEIDA-MURADIAN, L. B.; PAMPLONA, L. C.; COIMBRA, S.; BARTH, O. M. Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 18, p. 105 – 111, 2005.

ARAÚJO, C. A. C.; ALEGRIO, L. V.; LEON, L. L. Antileishmanial activity of compounds extracted and characterized from *Centrolobium sclerophyllum*. **Phytochemistry**, v.49, p. 751–754, 1998.

AYRES D. C.; MARCUCCI, M. C.; GIORGIO, S. Effects of Brazilian propolis on *Leishmania amazonensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. v. 102 (2), p. 215-220, Rio de Janeiro, 2007.

BALANA, F. R.; REGUERA, R.; CUBRIA, J. C.; ORDONEZ, D. The pharmacology of leishmaniasis. **General Pharmacology**, v. 30, p. 435–443, 1998.

BANKOVA, V. Recent trends and important developments in propolis research. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, p. 29-32, 2005.

BANKOVA, V. S.; CASTRO, S. L.; MARCUCCI, M. C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v.31, p. 3-15, 2000.

BANKOVA, V.; BOUDOUROVA-KRASTEVA, G.; POPOV, S.; SFORCIN, J. M.; FUNARI, S. R. C. Seasonal variations of the chemical composition of Brazilian propolis. **Apidologie**, v. 29, p. 361-367, 1998.

BARATA, L. E. S.; SANTOS, L. S.; FERRI, P. H.; PHILLIPSON, F. J. D.; PAINE, A.; CROFT, S. L. Antil-leishmanial activity of neoligans from *Virola* species and synthetic analogues. **Phytochemistry**, v. 55, p. 589–595, 2000.

BARTH, O. M. Melissopalynology in Brazil: A review of pollen analysis of honeys, propolis and pollen loads of bees. **Scientia Agricola**, v.61, n.3, p. 342-350, 2004.

BERGER, I.; PASSREITER, C. M.; CA´CERES, A.; KUBELKA, W. Antiprotozoal activity of *Neurolaena lobata*. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 327–330, 2001.

BERNHARD, D.; SCHWAIGER, W.; CRAZZOLARA, R.; TINHOFER, I.; KOFLER, R.; CSORDAS, A. Enhanced MTT-reducing activity under growth

inhibition by resveratrol in CEM-C7H2 lymphocytic leukemia cells. *Cancer letters*, v. 195, p. 193-199, 2003.

BLONSKA, M.; BRONIKOWSKA, J.; PIETSZ, G.; CZUBA, Z. P.; SCHELLER, S.; KROL, W. Effects of ethanol extract of propolis (EEP) and its flavones on inducible gene expression in J774A.1 macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 91, p. 25–30, 2004.

BOECK, P.; FALCÃO, C. A. B.; LEAL, P. C.; YUNES, R. A.; FILHO, V. C.; SANTOS, E. C. T.; BERGMANN, B. R. Synthesis of chalcone analogues with increased antileishmanial activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 14, p. 1538-1545, 2006.

BRASIL. Ministério de Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa n.º 3 de 19 de Janeiro 2001. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Pólen Apícola. **Diário oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 23 jan. 2001. Seção 1, p.18–23. Disponível em: <http://www.sebraern.com.br/apicultura/legislacao/inst_norm_03.doc>. Acesso em: 02 mar. 2009.

BRAVO, J. A.; SAUVAIN, M.; GIMENEZ, A.; MUNOZ, V.; CALLAPA, J.; LE MEN-OLIVIER, L.; MASSIOT, G.; LAVAUD, C. Bioactive phenolic glycosides from *Amburana cearensis*. *Phytochemistry*, v. 50, p. 71–74, 1999.

BRINGMAN, G.; HAMM, A.; GUNTHER, C.; MICHEL, M.; BRUN, R.; MUDOGO, V. Ancistroealaines A and B, two new bioactive naphthlisoquinolines, and related naphthoic acids from *Ancistrocladus ealaensis*. *Journal Natural Products*, v. 63, p.1465–1470, 2000.

BRITO, A. R.; BRITO, A. A. S. Forty years of Brazilian medicinal plant research. *Journal of Ethnopharmacol.*, v. 39, p. 53-67, 1993.

BRÜCKER, G.; GENTILINI, M. **Las Leishmaniasis em América Latina**. Paris: La Fondation Rhône-Poulenc Snaté, p. 30, 1987.

BUDAVARI, S.; O'NEIL, M. J.; SMITH, A.; HECKELMAN, P. E. **The Merck Index**. 11th edition. NJ, USA: Merck & Co., Inc., 1989.

CALAND NETO, L. B. Caracterização da própolis de Pio IX por cromatografia gasosa/espectrometria de massas e infusão direta. **Trabalho não publicado**, 2010.

CALIXTO J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytoterapeutic agents). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 33, p. 179-189, 2000.

CAMACHO, M. D. R.; MATA, R.; CASTANEDA, P.; KIRBY, G. C.; WARHUST, D. C.; CROFT, S. L.; PHILLIPSON, J. D. Bioactive compounds from *Celaenodredon mexicanum*. *Planta Medica*, v. 66, p. 462–468, 2000.

CAMARGO, R. C. R.; REGO, J. G. S.; LOPES, M. T. R.; PEREIRA, F. M. Boas práticas na produção e beneficiamento de pólen apícola desidratado. **Documentos**, v. 81. Teresina: Embrapa Meio Norte, 2006.

CAMPOS, M. B.; GOMES, C. C.; PIRES, R. N. B.; BRANDÃO, J. A.; MARTINS, A. P.; ELISEU, L. S.; CORBETT, C.; SILVEIRA, F. T. Avaliação in vitro da infectividade de *Leishmania (Viannia) braziliensis* isolada de diferentes formas clínicas de LTA. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 443, 2003. Suplemento I.

CAPASSO, F.; CASTALDO, S. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, v. 73, S1-6, 2002.

CARPES, S. T.; PRADO, A.; MORENO, I. A. M.; MOURÃO, G. B.; ALENCAR, S. M.; MASSON, M. L. Avaliação do potencial antioxidante do pólen apícola produzido na região sul do Brasil. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1660 – 1664, 2008.

CARVALHO, P. B.; ARRIBAS, M. A. G.; FERREIRA, E. I.. Leishmaniasis. What do we know about its chemotherapy? **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 36, p. 69–96, 2000. Suplemento 1.

CARVALHO, P. B.; FERREIRA, E. I. Leishmaniasis phytotherapy. Nature's leadership against an ancient disease— review. **Fitoterapia**, v. 72, p. 599–618, 2001.

CHANCE, M. L. New developments in the chemotherapy of leishmaniasis. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 89, p. 37–43, 1995.

CHEN, M.; CHRISTENSEN, S. B.; BLOM, J.; LEMMICH, E.; NADELMANN, L.; FICH, K.; THEANDER, T. G.; KHARAZMI, A. Licochalcone A, a novel antiparasitic agent with potent activity against human pathogenic protozoan species of *Leishmania*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 37, p. 2550–2556, 1993.

CHRISTENSEN, S. B.; MING, C.; ANDERSEN, L.; HJORNE, U.; OLSEN, C. E.; CORNETT, C.; THEANDER, T. G.; KHARAZMI, A. An antileishmanial chalcone from Chinese licorice roots. **Planta Medica**, v. 60, p. 121–123, 1994.

COMPAGNONE, R. S.; PINA, I. C.; RANGEL, H. R.; DAGGER, F.; SUAREZ, A. I.; REDDY, M. V. R.; FAULKNER, D. J. Antileishmanial cyclic peroxides from the Palauan sponge *Plakortis aff. angulospiculatus*. **Tetrahedron**, v. 54, p. 3057–3068, 1998.

COOK, J. A.; HOLBROOK, T. W.; PARKER, B. W. Visceral leishmaniasis in mice: protective effect of glucan. **Journal of the Reticuloendothelial Society**, v. 27, p. 567–573, 1980.

COSTA, P. R. R. Produtos naturais como ponto de partida para a descoberta de novas substâncias bioativas: candidatos a fármacos com ação antiofídica, anticâncer e antiparasitária. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n 1, p. 58-65, 2009.

CROFT, S. L.; COOMBS, G. H. Leishmaniasis - current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends in Parasitology**, v. 19, p. 502-508, 2003.

CUNNINGHAM, L. V.; KAZAN, B. H.; KUWAHARA, S. S. Effect of long-chain fatty acids on some trypanosomatid flagellates. **Journal of General Microbiology**, v. 70, p. 491–496, 1972.

CUNNINGHAM, A. C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by leishmania. *Exp. Mol. Pathol.*, v. 2, n. 72, p. 132-141, 2002.

DA SILVA, J. F. M.; SOUZA, M. C.; MATTA, S. R.; ANDRADE, M. R.; VIDAL, F. V. N. Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities. **Food Chemistry**, v. 99, p. 431-435, 2006.

DELORENZI, J. C.; ATTIAS, M.; GATTASS, C. R.; ABDRADE, M.; REZENDE, C.; CUNHA-PINTO, A.; HENRIQUE, A. T.; BOU-HABIB, D. C.; SARAIVA, E. M. Antileishmanial activity of an indole alkaloid from *Peschiera australis*. *Antimicrob. Agents Chemotherapy*, v. 45, p. 1349–1354, 2001.

DESJEUX, P.; ALVAR, J. Leishmania/HIV co-infection: epidemiology in Europe. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 97, p. 4–15, 2003.

DEUS, A. S. O.; NUNES, L. C. C.; LOPES, J. A. D.; CITÓ, A. M. G. L. **Saúde Bucal: Desenvolvimento farmacotécnico de formas farmacêuticas contendo extrato de própolis**. Anais do XVII Seminário de Iniciação Científica da UFPI - III Congresso de C,T&I, 2008.

DORVAL, M. E. M. C.; OSHIRO, E. T.; CUPOLLILO, E.; CASTRO, A. C. C.; ALVES, T. P. Ocorrência de leishmaniose tegumentar americana no Estado do Mato Grosso do Sul associada à infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n., p. 143-46, 2006.

Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Databases. Disponível em: www.ars-grin.gov/duke. Acessado em 06/03/2010.

EMAM, A. M.; MOUSSA, A. M.; ESSA, M. A.; FAURE, R.; ELIAS, R.; BALANSARD, G.; BOUDON, G. Isolation of phenylpropanoid glycosides from *Buddleja madagascariensis* Lam. leaves. **Pharmaceutical and Pharmacological Letters**, v. 5, p. 177–178, 1995.

EMAM, A. M.; MOUSSA, A. M.; FAURE, R.; FAVEL, A.; DELMAS, F.; ELIAS, R.; BALANSARD, G. Isolation and biological study of a triterpenoid saponin, mimengoside A, from the leaves of *Buddleja madagascariensis*. **Planta Medica**, v. 62, p. 92–93, 1996.

FERNANDES, H. B. **Investigação da atividade gastroprotetora do extrato etanólico das folhas de *Parkia platycephala* Benth. e da fração hidroalcoólica extraída das folhas de *Cenostigma macrophyllum* Tul. var.**

***acuminata* Teles Freire (Leguminosae) em roedores.** 2009. 91f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2009.

FERREIRA, M. E.; DE ARIAS, R. A.; DE ORTIZ, S.T.; INCHAUSTI, A.; NAKAYAMA, H. C.; THOUVENEL, A. C.; HOCQUEMILLER, R.; FOURNET, A. Leishmanicidal activity of two canthin-6-one alkaloids, two major constituents of *Zanthoxylum chiloperone* var. *angustifolium*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 80, p. 199-202, 2002.

FERREIRA, S. H.; BARATA, L. E. S.; SALLES, S. L. M.; QUEIRÓZ, S. R. R.; HELUY NETO, N. E. **Anais da Academia Brasileira Ciências**, v.12, p.33, 1998.

FEVRIER, A.; FERREIRA, M. E.; FOURNET, A.; YALUFF, G.; INCHAUSTI, A.; ARIAS, A. R.; HOCQUEMILLER, R.; WAECHTER, A. I. Acetogenins and other compounds from *Rollinia emarginata* and their antiprotozoal activities. **Planta Medica**, v. 65, p. 47-49, 1999.

FLEURETIN, J.; PELT, J-M. Les plantes médicinales. **La Recherche**, v.21, p.811-818. 1990.

FOURNET, A.; FERREIRA, M. E.; ARIAS, A. R.; FUENTES, S.; TORRES, S.; INCHAUSTI, A.; YALUFF, A.; NAKAYAMA, H.; MAHIOU, V.; HOCQUEMILLER, R.; CAVE, A. In vitro and in vivo leishmanicidal studies of *Peperomia galioides* (Piperaceae). **Phytomedicine**, v. 3, p. 271-275, 1996.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Análise de Própolis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 171-178, 2006.

GHOSH, B. K. Action of an antifungal antibiotic, nystatin, on the protozoa *Leishmania donovani*. Studies on the cytological and cytochemical changes. Ann. Biochem. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 23, p. 193-200, 1963.

GONZÁLEZ, P.; MARÍN, C.; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, I.; HITOS, A. B.; ROSALES, M. J.; REINA, M.; DÍAZ, J. G.; GONZÁLEZ-COLOMA, A.; SÁNCHEZ-MORENO, M. In vitro activity of C20-diterpenoid alkaloid derivatives in promastigotes an intracellular of *Leishmania infantum*. **The International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 25, p. 136-141, 2004.

HAZRA, B.; GHOSH, R.; BANERJEE, A.; KIRBY, G. C.; WARHURST, D. C.; PHILLIPSON, J. D. In vitro antiplasmodial effects of diospyrin, a plant-derived naphthoquinoid, and a novel series of derivatives. **Phytotherapy Research**, v. 9, p. 72-74, 1995.

HIRAOKA, O.; SATAKE, H.; IGUCHI, S.; MATSUDA, A.; UEDA, T.; WATAYA, Y. Carbocyclic inosine as a potent antileishmanial agent: the metabolism and selective cytotoxic effects of carbocyclic inosine in promastigotes of *Leishmania tropica* and *Leishmania donovani*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 134, p. 1114-1121, 1986.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Screening of some plants used in the Brazilian medicine for treatment of infectious disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 1027-1031, 2002.

HRASSNIGG, N.; CRAILSHEIM, K. The influence of brood on the pollen consumption of worker bees (*Apis mellifera* L.). **Journal of Insect Physiology**, v. 44, p. 393 – 404, 1998.

HUMAN, H.; NICOLSON, S. W.; STRAUSS, K.; PIRK, C. W. W.; DIETEMANN, V. Influence of pollen quality on ovarian development in honeybee workers (*Apis mellifera scutellata*). **Journal of Insect Physiology**, v. 53, p. 649 – 655, 2007.

INCHAUSTI, A.; YALUFF, G.; ARIAS, A. R.; TORRES, S.; FERREIRA, M. E.; NAKAYAMA, H.; SCHININI, A.; LORENZEN, K.; ANKE, T.; FOURNET, A. Leishmanicidal and trypanocidal activity of extracts and secondary metabolites from Basidiomycetes. **Phytotherapy Research**, v. 11, p. 193–197, 1997.

IOIRICH, N. P. **As abelhas, farmacêuticas com asas**. 2ed. Mir: Moscou, p. 248, 1986.

KAISER, O.; KIDERLEN, A. F.; CROFT, S. L. Natural products as antiparasitic drugs. **Parasitology Research**, v. 90, p.55–62, 2003.

KAM, T. S.; SIM, K. M.; KOYANO, T.; TOYOSHIMA, M.; HAYASHI, M.; KOMYIAMA, K. Cytotoxic and leishmanicidal aminoglycosteroids and aminosteroids from *Holarrhena curtisii*. **Journal of Natural Products**, v. 61, p. 1332–1336, 1997.

KANE, M. M.; MOSSER, D. M. Leishmania parasites and their ploys to disrupt macrophage activation. **Curr. Opin. Hematol.**, v. 7, p. 26-31, 2000.

KARTAL, M.; YILDIZ, S.; KAYA, S.; KURUCU, S.; TOPÇU, G. Antimicrobial activity of propolis samples from two different regions of Anatolia. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 86, p. 69–73, 2003.

KAUR, K.; PATEL, S. R.; PATIL, P.; JAIN, M.; KHAN, S. I.; JACOB, M. R.; GANESAN, S.; TEKWANI, B. L.; JAIN, R. Synthesis, antimalarial, antileishmanial, antimicrobial, cytotoxicity, and methemoglobin (MetHB) formation activities of new 8-quinolinamines. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 915-930, 2006.

KAYSER, O.; KIDERLEN, A. F. Leishmanicidal activity of aurones. **Tokai J. Clinical and Experimental Medicine**, v. 23, p. 423–426, 1999.

KAYSER, O.; KIDERLEN, A. F. *In vitro* leishmanicidal activity of naturally occurring chalcones. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 148–152, 2001.

KAYSER, O.; KIDERLEN, A. F.; BERTELS, S.; SIEMS, K. Antileishmanial activities of aphidicolin and its semisynthetic derivatives. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, p. 288–292, 2001.

KAYSER, O.; KIDERLEN, A.F.; LAATSCH, H.; CROFT, S. L. *In vitro* leishmanicidal activity of monomeric and dimeric naphthoquinones. **Acta Tropica**, v. 77, p. 371-376, 2000.

KOSHIMIZU, K.; OHIGASHI, H.; HUFFMAN, M. A. Use of *Vernonia amygdalina* by wild chimpanzee: possible roles of its bitter and related constituents. **Physiology & Behavior**, v. 56, p. 1209–1216, 1994.

KROYER, G.; HEGEDUS, N. Evaluation of bioactive properties of pollen extracts as functional dietary food supplement. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 2, p. 171-174, 2001.

KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry**, v. 84, p. 329-339, 2004.

LAVAUD, C.; MASSIOT, G.; VASQUEZ, C.; MORETII, C.; SAUVAIN, M.; BALDERRAMA, L. 4-Quinolinone alkaloids from *Dictyoloma peruviana*. **Phytochemistry**, v. 40, p. 317–320, 1995.

LEJA, M.; MARECZEK, A.; WYZGOLIK, G.; KLEPACZ-BANIAK, K. Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species. **Food Chemistry**, v. 100, p. 237–240, 2007.

LIMA NETO, J. S. **Pólen de abelhas sem ferrão (*Scaptotrigona* sp.) de Monsenhor Gil – PI: Análise palinológica, constituintes químicos e estudo cinético frente ao DPPH**. 2009. 165f. Dissertação (Mestrado em Química) Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2009.

LIMA, M. G. A produção de própolis no Brasil. São João da Boa Vista: São Sebastião Editora e Gráfica, 2006.

LIU, C. F.; LIN, C. H.; LIN, C. C.; LIN, Y. H.; CHEN, C. F.; LIN, C. K.; LIN, S. C. Antioxidative natural product protect against econazole-induced liver injuries. **Toxicology**, v. 196, p. 87–93, 2004.

MACHADO, G. M. C.; LEON, L. L.; CASTRO, S. L. Activity of Brazilian and Bulgarian própolis against different species of *Leishmania*. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 73-77, 2007.

MAHIOU, V.; ROBLOT, F.; HOCQUEMILLER, R.; CAVE´, A.; ARIAS, A. R.; INCHAUSTI, A.; YALUFF, G.; FOURNET, A. New prenylated quinones from *Peperomia galioides*. **Journal of Natural Products**, v. 59, p. 694–697, 1996.

MAHIOU, V.; ROBLOT, F.; HOCQUEMILLER, R.; CAVE´, A.; ARIAS, R.; INCHAUSTI, A.; YALUFF, G.; FOURNET, A.; ANGELO, A. New aporphine alkaloids from *Guatteria foliosa*. **Journal of Natural Products**, v. 57, p. 890–895, 1994.

MARCUCCI, M. C. Propolis: Chemical composition, biological properties and therapeutic activities. **Apidologie**, v. 26, p. 83-99, 1995.

MARCUCCI, M. C.; RODRIGUEZ, J.; FERRERES, F.; BANKOVA, V.; GROTO, R.; POPOV, S. Chemical composition of Brazilian própolis of São Paulo state. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 53c, p. 117-119, 1998.

MITTAL, N.; GUPTA, N.; SAKSENA, S.; GOYAL, N.; ROY, U.; RASTOGI, A. K. Protective effect of picroliv from *Picrorhiza kurroa* against *Leishmania donovani* infections in *Mesocricetus auratus*. **Life Sciences**, v. 63, p. 1823–1834, 1998.

MITTRA, B.; SAHA, A.; CHOWDHURY, A. R.; PAL, C.; MANDAL, S.; MUKHOPADHYAY, S.; BANDYOPADHYAY, S.; MAJUMDER, H. K. Luteolin, an abundant dietary component is a potent anti-leishmanial agent that acts by inducing topoisomerase II-mediated kinetoplast DNA cleavage leading to apoptosis. **Molecular Medicine**, New York, v. 6, p. 527–541, 2000.

MONTANARI, C. A. Química medicinal: contribuição e perspectiva no desenvolvimento da farmacoterapia. **Química Nova**, v.18, p. 56, 1995.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. PLANEJAMENTO RACIONAL DE FÁRMACOS BASEADO EM PRODUTOS NATURAIS. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 105-111, 2001.

MORALES, G.; SIERRA, P.; BORQUEZ, J.; LOYOLA, L. A. Rigidusine, a new glycoditerpenoid from *Haplopappus rigidus*. **Boletín de la Sociedad Chilena de Química**, v. 45, p. 611–614, 2000.

MORETII, C.; SAUVAIN, M.; LAVAUD, C.; MASSIOT, G.; BRAVO, J. A.; MUNOZ, V. A novel antiprotozoal aminosteroid from *Saracha punctata*. **Journal of Natural Products**, v. 61, p. 1390–1393, 1998.

NOGUEIRA, I. A. L.; LEÃO, A. B. B.; VIEIRA, M. S.; BENFICA, P. L.; BOZINIS, M. C. V. Efeito Citotóxico do *Synadenium umbellatum*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 4, n. 2, p. 50-53, 2007. Suplemento.

NOGUEIRA-NETO, P. N. Vida e Criação de Abelhas indígenas sem ferrão, São Paulo: Nogueirapis, p. 447, 1997.

NUNES, L. C. C. **Caracterização de própolis - desenvolvimento tecnológico de gel vaginal e ensaios in vitro e in vivo da atividade anti-inflamatória e antimicrobiana**. 2008. 123f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2008.

NUNES, L. C. C.; GALINDO, A. B.; DEUS, A. S. O.; RUFINO, D. A.; RANDAU, K. P.; XAVIER, H. S.; CITÓ, A. M. G. L.; ROLIM NETO, P. J. Variabilidade sazonal dos constituintes da própolis vermelha e bioatividade em *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 524-529, 2009.

PAGLIARONE, A. C.; MISSIMA, F.; ORSATTI, C. L.; BACHIEGA, T. F.; SFORCIN, J. M. Propolis effect on Th1/Th2 cytokines production by acutely stressed mice. **Journal of Ethnofarmacology** v. 125, p. 230-233, 2009.

- PAREDES, R.; MUÑOZ, J.; DIAZ, I.; DOMINGO, P.; GURGUI, M.; CLOTET, B. Leishmaniasis in HIV Infection. **Journal of Postgraduate Medicine**, v. 49, n. 1, p. 39-43, 2003.
- 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.; ABREU, J. A. S.; ALCICI, N. M. F. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 3, p. 313-318, 1998.
- PEARSON, R. D.; SOUSA, A. Q. Clinical spectrum of leishmaniasis. **Clin Infect. Dis.**, v. 22, p. 1-13, 1996.
- PEREIRA, A. S.; SEIXAS, F. R. M. S.; AQUINO NETO, F. R. Própolis: 100 anos de pesquisas e suas perspectivas futuras. **Química Nova**, v. 25, p. 321-326, 2002.
- PIETERS, L.; VLIETINCK, A. J. Bioguided isolation of pharmacologically active plant components, still a valuable strategy for the finding of new lead compounds? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 57-60, 2005.
- PIETTA, P. G.; GARDANA, C.; PIETTA, A. M. Analytical methods for quality control of propolis. **Fitoterapia**, v. 73 Suppl. 1, p. S7-S20, 2002.
- PINTO, A. C. O Brasil dos viajantes e dos exploradores e a química de produtos naturais brasileira. **Química Nova**, v.18, p. 608, 1995.
- PLOCK, A.; SOKOLOWSKA-KOHLER, W.; PRESBER, W. Application of flow cytometry and microscopical methods to characterize the effect of herbal drugs on Leishmania spp. **Experimental Parasitology**, v. 97, p. 141-153, 2001.
- PRYTYK, E.; DANTAS, A. P.; SALOMÃO, K.; PEREIRA, A. S.; BANKOVA, V.; CASTRO, S. L.; AQUINO NETO, F. R. Flavonoids and trypanocidal activity of Bulgarian própolis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 88, p. 189-193, 2003.
- QUEIROZ, E. F.; ROBLOT, F.; HOCQUEMILLER, R.; CAVE´, A.; BARRIOS, A. A.; FOURNET, A.; DUCROT, P. H. Pseudo and spinosine, two catecholic berberines from *Annona spinescens*. **Journal of Natural Products**, v. 59, p. 438-440, 1996.
- RASMUSSEN, H. B.; CHRISTENSEN, S. B.; KVIST, L. P.; KHARAZMI, A.; HUANSI, A. G. Absolute configuration and antiprotozoal activity of minquartynoic acid. **Journal of Natural Product.**, v. 63, p. 1295-1296, 2000.
- RATES S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603- 613, 2001.
- REINBOTHE, C.; DIETRICH, B.; LUCKNER, M.J.; **Plant Physiology**, v. 137, p. 224, 1990.

- ROCHA, L. G.; ALMEIDA, J. R. G. S.; MACÊDO, R. O.; BARBOSA_FILHO, J. M. A review of natural products with antileishmanial activity. **Phytomedicine**, v. 12, p. 514–535, 2005.
- ROMERO, A. M. D.; LOISEAU, P. M.; CHAZALET, M. S. P. Interaction of sistamaquine with membrane lipids of *Leishmania donovani* promastigotes. **Biochimica et Biophysica Acta.**, v. 1768, p. 246-52, 2007.
- ROYO, V. A.; SANTOS, F. F.; SOUZA, V. A.; PEREIRA, A. C.; DA SILVA, R.; VINHÓLIS, A. H. C.; DONATE, P. M.; SILVA, M. L. A.; ALBUQUERQUE, S.; BASTOS, J. K. Biological activity evaluation of dibenzilbutirolactones lignans derivates against *Leishmania braziliensis*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 18-21, 2003.
- SALATINO, A.; TEIXEIRA, E. W.; NEGRI, G.; MESSAGE, D. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. **eCAM 2**, p. 33-38, 2005.
- SANTOS, D. B. **Estudo dos efeitos do extrato das folhas da *Cenostima macrophyllum* Tul. var. *acuminata* Teles Freire sobre parâmetros reprodutivos e histopatológicos em ratas**. 2009. 45f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Universidade federal do Piauí, Teresina, 2009.
- SANTOS, L. G. P. **Florística e conhecimento botânico tradicional em áreas de cerrado no município de Monsenhor Gil, Piauí, Brasil**. 2008. 101f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente), Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2008.
- SANTOS, M.; MESSAGE, D.; CRUZ, C. Influência dos fatores climáticos na coleta de própolis em abelhas africanizadas *Apis mellifera* L. **Anais do XI Congresso Brasileiro de Apicultura**, Teresina. p. 372. 1996.
- SAUVAIN, M.; KUNESCH, N.; POISSON, J.; GANTIER, J. C.; GAYRAL, P.; DEDET, J. P. Isolation of leishmanicidal triterpenes and lignans from the amazonian liana *Dolioscarpus dentatus* (Dilleniaceae). **Phytotherapy Research**, v. 10, p. 1–4, 1996.
- SAVORNIN, B. M.; ELIAS, R.; DIAZ-LANZA, A. M.; BALANSARD, G.; GASQUET, M.; DELMAS, F. Saponins of the ivy plant, *Hedera helix*, and their leishmanicidal activity. **Planta Medica**, v. 57, p. 260–262, 1991.
- SENECA, H.; HENDERSON, E.; HARVEY, M. Effect of hyaluronidase and of hyaluronic acid on cultures of Trypanosomes, *Leishmania*, and Ameba. **Science**, v. 108, p. 714–715, 1948.
- SILVA, O. V. **Avaliação do teste de aglutinação direta (TAD) no diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana (LTA)**. 2003. 78f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública). Fundação Oswaldo Cruz-Centro de Pesquisa Ageu Magalhães. Recife, 2003.
- SILVA, M. S. S.; CHAVES, M. H.; LOPES, J. A. D.; CITÓ, A. M. G. L. Triterpenóides tipo cicloartano de própolis de Teresina - PI. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 801-804, 2005.

SILVA, M. S. S.; DE LIMA, S. G.; Oliveira, E. H.; LOPES, J. A. D.; CHAVES, M. H.; REIS, F. A. M.; CITÓ, A. M. G. L. Anacardic acid derivatives from Brazilian propolis and their antibacterial activity. **Eclética Química**, v. 33, p. 53-58, 2008.

SILVEIRA, F. A.; MELO, G. A. R.; ALMEIDA, E. A. B. **Abelhas Brasileiras: sistemática e identificação**. F. A. Silveira: Belo Horizonte, 253 p., 2002.

SIMÕES, L. M. C.; GREGÓRIO, L. E.; DA SILVA FILHO, A. A.; SOUZA, M. L.; AZZOLINI, A. E. C. S.; BASTOS, J. K.; LUCISANO-VALIM, Y. M. Effect of Brazilian green propolis on the production of reactive oxygen species by stimulated neutrophils. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, p. 59–65, 2004.

SITTIE, A. A.; LEMMICH, E.; OLSEN, C. E.; HVIDD, L.; KHARAZMI, A.; NKURUMAH, F. K.; CHRISTENSEN, S. B. Structure activity studies: in vitro antileishmanial and antimalarial activities of anthraquinones from *Morinda lucida*. **Planta Medica**, v. 65, p. 316–319, 1999.

SOARES, A. K. A.; CARMO, G. C.; QUENTAL, D. P.; NASCIMENTO, D. F.; BEZERRA, F. A. F.; MORAES, M. O.; MORAES, M. E. A. Avaliação da segurança clínica de um fitoterápico contendo *Mikania glomerata*, *Grindelia robusta*, *Copaifera officinalis*, *Myroxylon toluifera*, *Nasturtium officinale*, própolis e mel em voluntários saudáveis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 447-454, 2006.

SOARES, C. D.; PEREIRA, C. G.; MEIRELES, A. A.; SARAIVA, E. A. Leishmanicidal activity of a supercritical fluid fraction obtained from *Tabernaemontana catharinensis*. **Parasitology International**, v. 56, p. 135-139, 2007.

SOARES-BEZERRA, R. J.; LEON, L.; GENESTRA, M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 2, p. 139-149, 2004.

SOMERVILLE, D. C. **Nutritional value of bee collected pollens**. NSW Agriculture, Rural Industries Research and Development Corporation (ed.), Barton, Austrálie, Publication n°01/047, 176 p. 2001.

SOUZA, S. A. A.; CITÓ, A. M. G. L.; LOPES, J. A. D.; CHAVES, M. H.; SOUZA, C. M. L. Estudo da própolis produzida na cidade de Pio IX-PI. Anais do XII Seminário de Iniciação Científica da UFPI, p. 63, 2003.

SOUZA, S. A. A.; CITÓ, A. M. G. L.; LOPES, J. A. D. Constituintes do óleo essencial da própolis produzida na cidade de Pio IX-Piauí. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 8, n. 4, p.1-3, 2006.

SOUZA, F. C. F.; MELO, C. T. V.; CITÓ, M. C. O.; FÉLIX, F. H. C.; VASCONCELOS, S. M. M.; FONTELES, M. M. F.; BARBOSA FILHO, J. M.; VIANA, G. S. B. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: Uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. **Revista Brasileira de farmacognosia**, v. 18, p. 642-654, 2008.

SOUZA, R. C. S.; YUYAMA, L. K. O.; AGUIAR, J. P. L.; OLIVEIRA, F. P. M. Valor nutricional do mel e pólen de abelhas sem ferrão da região amazônica. **Acta Amazônica**, v. 32, n. 2, p. 333-336, 2004.

STAERK, D.; LEMMICH, E.; CHRISTENSEN, J.; KHARAZMIL, A.; OLSEN, C. E.; JAROSZEWSKI, J. W. Leishmanicidal, antiplasmodial and cytotoxic activity of indole alkaloids from *Corynanthe pachyceras*. **Planta Medica**, v. 66, p. 531–536, 2000.

TANDON, J. S.; SRIVASTAVA, V.; GURU, P. Y. Iridoids: a new class of leishmanicidal agents from *Nyctanthes arbortristis*. **Journal of Natural Products**, v. 54, p. 1102–1104, 1991.

TERRA, F. Leishmaniose tegumentare au Brésil. **Boletim da Sociedade Brasileira de Dermatologia**, v.2, p.58-67, 1913.

THEODOS, C. M.; POVINELLI, L.; MOLINA, R.; SHERRY, B.; TITUS, R. G. Role of tumor necrosis factor in macrophage leishmanicidal activity in vitro and resistance to cutaneous leishmaniasis in vivo. **Infect. Immun.**, v. 59, n. 8, p. 2839-2842, 1991.

TORRES, R. N. S. **Constituintes voláteis de própolis piauiense obtidos pelas técnicas de microhidrodestilação e *headspace* dinâmico**. 2007. 190f. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2007.

TORRES, R. N. S.; MOITA NETO, J. M.; LOPES, J. A. D.; CITÓ, A. M. G. L. Constituintes Voláteis de Própolis Piauiense. **Química Nova**, v. 31, p. 479-485, 2008.

TORRES-SANTOS, E. C. S.; MOREIRA, D. L.; KAPLAN, A. M. C.; MEIRELLES, M. N.; ROSSI-BERGMANN, B. Selective effect of 20,60-dihydroxy-40-methoxychalcone isolated from *Piper aduncum* on *Leishmania amazonensis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, p. 1234–1241, 1999.

VARGAS, A. C.; LOGUERCIO, A. P.; WITT, N. M.; DA COSTA, M. M.; SÁ E SILVA, M.; VIANA, L. R. Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcoólico de própolis. **Ciência Rural**, v. 34, p. 159-163, 2004.

VEIGA-JUNIOR V. F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 308-313, 2008.

VIEGAS, J. R. C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, No. 2, 326-337, 2006.

VIEIRA, G. H. C.; MARCHINI, L. C.; SOUZA, B. A.; MORETI, A. C. C. C. Fontes florais usadas por abelhas (Hymenoptera, Apoidea) em área de cerrado do município de Cassilândia, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 5, p. 1454 – 1460, 2008.

WAECHTER, A. I.; FERREIRA, M. E.; FOURNET, A.; ARIAS, A. R.; NAKAYAMA, H.; TORRES, S.; HOCQUEMILLER, R.; CAVE´, A. Experimental treatment of cutaneous leishmaniasis with argentilactone isolated from *Annona haematantha*. **Planta Medica**, v. 63, p. 433–435, 1997.

WAECHTER, A. I.; YALUFF, G.; INCHAUSTI, A.; ARIAS, A. R.; HOCQUEMILLER, R.; CAVE´, A.; FOURNET, A. Leishmanicidal and trypanocidal activities of acetogenins isolated from *Annona glauca*. **Phytotherapy Research**, v. 12, p. 541–544, 1998.

WILLIAMS, C.; ESPINOSA, O. A.; MONTENEGRO, H.; CUBILLA, L.; CAPSON, T. L.; ORTEGA-BARRÍA, E.; ROMERO, L. I. Hydrosoluble formazan XTT: its application to natural products drug discovery for *Leishmania*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 55, p. 813-816, 2003.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V.; Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v. 24, p. 147, 2001.

ZERBO, A. C.; MORAES, R. L. M. S.; BROCHETTO-BRAGA, M. R. Protein requirements in larvae and adults of *Scaptotrigona postica* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae): midgut proteolytic activity and pollen digestion. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, v. 129, p. 139–147, 2001.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)