



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E TECNOLOGIA

MARCOS MARINHO DE SOUSA JUNIOR

**ATIVIDADE LEISHMANICIDA E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA PRÓPOLIS
VERMELHA PRODUZIDA NO ESTADO DO TOCANTINS, BRASIL**

IMPERATRIZ - MA

2021

MARCOS MARINHO DE SOUSA JUNIOR

**ATIVIDADE LEISHMANICIDA E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA PRÓPOLIS
VERMELHA PRODUZIDA NO ESTADO DO TOCANTINS, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Tecnologia da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Saúde e Tecnologia. Área de concentração: Interdisciplinar.

Orientador: Prof. Dr. Richard Pereira Dutra.
Coorientador: Prof. Dr. Aramys Silva dos Reis

IMPERATRIZ - MA

2021

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo autor.

Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Marinho de Sousa Júnior, Marcos.

Atividade leishmanicida e caracterização química da
própolis vermelha produzida no estado do Tocantins, Brasil
/ Marcos Marinho de Sousa Júnior. - 2021.

91 f.

Coorientador(a): Aramys Silva dos Reis.

Orientador(a): Richard Pereira Dutra.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em
Saúde e Tecnologia/ccsst, Universidade Federal do
Maranhão, Imperatriz - MA, 2021.

1. Composição química. 2. Isoflavonoides. 3.
Leishmania amazonensis. 4. Própolis vermelha. I. Pereira
Dutra, Richard. II. Silva dos Reis, Aramys. III. Título.

MARCOS MARINHO DE SOUSA JUNIOR

**ATIVIDADE LEISHMANICIDA E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA PRÓPOLIS
VERMELHA PRODUZIDA NO ESTADO DO TOCANTINS, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Tecnologia da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Saúde e Tecnologia. Área de concentração: Interdisciplinar.

Aprovado em: ____ / ____ /2021

BANCA EXAMINADORA

Prof^o Dr. Richard Pereira Dutra (Orientador)
Doutor em Biotecnologia
Universidade Federal do Maranhão

Prof^a Dr^a. Maria Aparecida Alves de Oliveira Serra
Doutora em Cirurgia
Universidade Federal do Maranhão

Prof^a Dr^a. Maria Nilce de Sousa Ribeiro
Doutora em Química Orgânica
Universidade Federal do Maranhão

AGRADECIMENTOS

A Deus pela dádiva da vida.

À minha família por sempre me apoiar em meus objetivos, principalmente minha mãe Sueli, minha irmã Jaynne, meu primo Dennys e minha namorada Ana Beatriz, que sempre estiveram presentes durante esse período de mestrado.

Ao Prof. Dr. Richard Pereira Dutra e o Prof. Dr. Aramys Silva dos Reis, por toda a orientação no desenvolvimento da pesquisa de dissertação. Muito obrigado!

Aos meus amigos Sara Sthephanny, Yasmim Vila Nova, Maxsuel Júnior, Prof. Laécio Macedo, Prof. Carlos Alexandre Holanda, Kélcio Miranda, Maria Simone, Gislane Mendonça, Paula Gabriele, Rafaela Araújo, Wanderson Barros, Karla Mota e Euzinete Borges que sempre estiveram presentes ajudando na pesquisa e em momentos bons e ruins.

À coordenação e aos professores do Programa de Pós-graduação em Saúde e Tecnologia, em especial aos professores Marcelino Santos, Maria Aparecida, Ismália Dias, Queli Cristina e Ana Lucia que sempre serviram/servem de exemplo a ser seguido.

Aos meus supervisores e amigos da empresa 55 soluções, Ranelson e Vanessa, que sempre me apoiaram a permanecer e persistir na pós-graduação e tornaram agradáveis os momentos de trabalho.

Ao apicultor Lourival Fernandes pela doação das amostras de própolis vermelha.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro para a pesquisa no Brasil.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento do projeto (Processo nº 424798/2018-2).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do estado do Maranhão (FAPEMA) pela concessão da bolsa de mestrado (Processo nº 003421/2019).

À Universidade Federal do Maranhão (UFMA) por proporcionar infraestrutura e condições para o desenvolvimento da pesquisa.

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma direta ou indiretamente com o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

A própolis vermelha brasileira é produzida na região Nordeste por abelhas da espécie *Apis mellifera* L. e tem como fonte botânica a espécie *Dalbergia ecastophyllum*. Na literatura são descritas atividades antibacteriana, antifúngica, antitumoral, antioxidante, anti-inflamatória, citotóxica e antiparasitária. O presente trabalho teve como objetivo realizar uma revisão de literatura sobre a composição química e atividade leishmanicida da própolis brasileira, avaliar a atividade leishmanicida, caracterizar a composição química e os tipos polínicos da própolis vermelha produzida no estado do Tocantins, Brasil. Região não mencionada na literatura como produtora desse tipo de própolis. No primeiro capítulo foi realizado o levantamento da literatura investigando publicações sobre avaliação da composição química e atividade leishmanicida da própolis brasileira nas bases de dados *National Library of Medicine - National Institutes of Health* (PubMed), *ScienceDirect*, *Scopus* e Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS) pelo método de revisão integrativa. A busca identificou 28 publicações entre os anos de 2004 a 2020 com própolis vermelha, verde e marrom. As análises químicas com óleos essenciais da própolis brasileira foram realizadas por ensaios de cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas e com ionização de chama (CG-EM, CG-FID), identificando a presença de monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanoides. Para análise de extratos hidroetanólicos foram empregadas técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ultravioleta e acoplada a espectrômetro de massas (CLAE/UV-Vis e CLAE-EM/EM), que identificaram terpenos, ácidos fenólicos, flavonoides e benzofenonas. Estudos avaliando a atividade leishmanicida de própolis brasileira para diferentes espécies de *Leishmania* concentram-se entre os anos de 2007 a 2020, utilizando extratos hidroetanólicos, óleos essenciais, nanopartículas poliméricas e complexos metálicos associados à própolis para a inibição de formas promastigotas e amastigotas. O segundo capítulo apresenta a identificação polínica da própolis pelo método de acetólise de Erdtman e a caracterização química por CLAE-EM/EM nos modos positivo e negativo. A análise botânica identificou 22 tipos polínicos, pertencentes a 15 famílias botânicas, com maior frequência para as famílias *Arecaceae*, *Asteraceae*, *Fabaceae*, *Myrtaceae*, *Melastomataceae*, *Rubiaceae* e *Urticaceae*, identificando espécies poliníferas e nectaríferas, contudo, não foi identificado o tipo polínico de *Dalbergia ecastophyllum*, espécie associada à produção da própolis vermelha no litoral nordeste do Brasil. Os espectros de massas obtidos por CLAE-EM/EM apresentaram um padrão de fragmentação dos íons precursores compatível com compostos das classes dos isoflavonoides, pterocarpanos, flavonona, chalcona, além da isoflavona condensada com uma chalcona (retusapurpurina). No terceiro capítulo os extratos e frações da própolis foram avaliados quanto à atividade leishmanicida contra a forma promastigotas de *Leishmania amazonensis* e citotoxicidade frente a macrófagos RAW 264.7, utilizando o método de viabilidade celular com o reagente brometo de 3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT), a concentração de fenóis totais e flavonoides foi obtida por espectrofotometria UV-Vis e a composição química por CLAE/UV-Vis. Os extratos inibiram as formas promastigotas, com CI_{50} variando de 21,98 a 86,12 $\mu\text{g/mL}$, enquanto a fração clorofórmica foi mais efetiva (16,02 $\mu\text{g/mL}$). A avaliação da citotoxicidade contra células Raw 264.7 demonstrou que o extrato de própolis vermelha e a fração clorofórmica apresentaram toxicidade celular em concentrações $\geq 100 \mu\text{g/mL}$. As amostras demonstraram elevada concentração de fenóis totais e flavonoides para os extratos e fração

clorofórmica, enquanto nas análises por CLAE/UV-Vis foi observado semelhança no perfil químico, com identificação dos compostos formononetina e biochanina A em todas as amostras, sendo considerados marcadores químicos. Os resultados permitem concluir que a própolis vermelha produzida no estado do Tocantins apresenta potencial leishmanicida, baixa toxicidade celular e elevadas concentrações de compostos fenólicos. Este é primeiro estudo com própolis vermelha produzida na região da Amazônia brasileira e contribuem para o desenvolvimento da apicultura do estado do Tocantins a partir da produção e comercialização de própolis vermelha.

Palavras-chave: Própolis vermelha. Composição química. *Leishmania amazonensis*. Isoflavonoides

ABSTRACT

Brazilian red propolis is produced in the Northeast Region of the country by *Apis mellifera* L. bees and has *Dalbergia ecastophyllum* as its botanical source. The literature describes propolis antibacterial, antifungal, antitumor, antioxidant, anti-inflammatory, cytotoxic, and antiparasitic activities. The objective of the present study was carrying out a literature review on the chemical composition and leishmanicidal activity of Brazilian propolis by evaluating the leishmanicidal activity and characterizing the chemical composition and palynological profile of red propolis produced in the Brazilian state of Tocantins, a region that has not been mentioned in the literature as a place known for the production of this type of propolis. The first chapter shows a literature survey and discusses studies on evaluation of the chemical composition and leishmanicidal activity of Brazilian propolis found in the following databases: National Library of Medicine (National Institutes of Health, PubMed), Science Direct, Scopus, and Latin America and Caribbean Center on Health Sciences Information. The integrative reviewing method was applied. The search identified 28 articles published between 2004 and 2020 addressing red, green, and brown propolis. Chemical analyses of Brazilian propolis essential oils were carried out by using gas chromatography associated with mass spectrometry or flame ionization and identified the presence of monoterpenes, sesquiterpenes, and phenylpropanoids. Analysis of hydroethanolic extracts were carried out by using high-performance liquid chromatography with UV-Vis detection (HPLC/UV-Vis) and connected to mass spectrometer (HPLC/MS), which identified terpenes, phenolic acids, flavonoids, and benzophenones. Studies that assessed the leishmanicidal activity of Brazilian propolis in different species of *Leishmania* were more abundant between 2007 and 2020 and reported use of hydroethanolic extracts, essential oils, polymeric nanoparticles, and metal complexes in combination with propolis to inhibit promastigote and amastigote forms. The second chapter shows the palynological profile of propolis obtained by applying Erdtman's acetolysis method and the chemical characterization performed by using HPLC/MS in both positive and negative modes. Botanical analysis identified 22 pollen types that belonged to 15 botanical families, among which Arecaceae, Asteraceae, Fabaceae, Myrtaceae, Melastomataceae, Rubiaceae, and Urticaceae were more frequent. Polliniferous and nectariferous species were identified. However, the palynological profile of *Dalbergia ecastophyllum*, a species related to production of red propolis in the Brazilian Northeast coast, was not obtained. Mass spectra obtained by using HPLC/MS showed a precursor ion fragmentation pattern compatible with compounds belonging to the classes of isoflavonoids, pterocarpanes, flavanones, chalcones, as well as isoflavones condensed with a chalcone (retusapurpurin). The third chapter shows the results of the evaluation of propolis extracts and fractions regarding leishmanicidal activity against the promastigote form of *Leishmania amazonensis* and cytotoxicity induced in RAW 264.7 macrophages measured by applying the cell viability method with (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Total phenolic content and flavonoid concentration were measured by using UV-vis spectrophotometry, whereas chemical composition was obtained by HPLC/MS. The extracts inhibited promastigote forms, with IC₅₀ ranging from 21.98 to 86.12 µg/mL. The chloroform fraction was the most effective (16.02 µg/mL). Evaluation of cytotoxicity against RAW 264.7 macrophages indicated that red propolis' extract and chloroform fraction showed cell toxicity for concentrations equal to or higher than 100 µg/mL.

The samples had high total phenolic content and flavonoid concentration for extracts and chloroform fraction, whereas HPLC/UV-Vis showed similar chemical profiles, with identification of the substances formononetin and biochanin A in all samples, which are considered chemical markers. The results allowed to conclude that red propolis produced in the Brazilian state of Tocantins has leishmanicidal potential, low cell toxicity, and high concentrations of phenolic compounds. This is the first study oriented toward characterizing red propolis produced in Brazilian Amazon and will contribute to the development of apiculture in Tocantins based on production and commercialization of this product.

Keywords: Red propolis. Chemical composition. *Leishmania amazonensis*. Isoflavonoids

LISTA DE ABREVIATURAS

- [M-H]⁻ íon molecular em modo negativo
- [M-H]⁺ íon molecular em modo positivo
- CAT-Like - catalase-like
- CC₅₀ - concentração citotóxica 50%
- CCDAL - Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência
- CE₅₀ – Concentração Efetiva 50%
- CG - Cromatografia gasosa
- CI₅₀ - concentração mínima inibitória 50%
- CI₉₀ - concentração mínima inibitória 90%
- CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência
- CLUE - Cromatografia líquida de ultra eficiência
- DPPH - 1,1-difenil-2-picril-hidrazil
- EAG - Equivalente a ácido gálico
- EC - Eletroforese capilar
- EHP - Extrato hidroalcoólico de própolis
- EQ - Equivalente a quercetina
- FrAcPv - Fração acetato de própolis vermelha
- FrClPv - Fração clorofórmica de própolis vermelha
- FrHxPv - Fração hexânica de própolis vermelha
- HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana
- INPI - Instituto Nacional de Pesquisa Industrial
- IR - Espectroscopia de infravermelho
- LC - Leishmaniose cutânea
- LCD - Leishmaniose cutânea difusa
- LM - Leishmaniose mucosa/mucocutânea
- LV - Leishmaniose visceral
- MIC - Concentração inibitória mínima
- MMC - Concentração mínima microbicida
- MTT - brometo de 3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio

OMS - Organização Mundial da Saúde

OPAS - Organização Pan-Americana da Saúde

PA - Pólen acessório

PD - Pólen dominante

PII - Pólen importante isolado

PIO - Pólen isolado ocasional

PV - Própolis vermelha

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

SOD-Like - superóxido dismutase like

tR, tempo de retenção em minutos

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

FIGURA 1 - *Apis mellifera* realizando a polinização

FIGURA 2 - Própolis vermelha em alça de coleta (A); Amostra de própolis vermelha (B)

FIGURA 3 - Ciclo de transmissão da Leishmaniose (a); Forma promastigota (b); Forma amastigota (c)

FIGURA 4 - Canídeo (a) e felino (b) com úlceras causadas por leishmaniose

CAPITULO I

FIGURA 1 - Representação esquemática das estratégias de seleção dos estudos.

QUADRO 1 - Composição química dos extratos de própolis brasileira.

QUADRO 2 - Atividade Leishmanicida da própolis brasileira

CAPITULO II

FIGURA 1 - Tipos polínicos identificados na própolis vermelha coletada no município de Esperantina – TO

FIGURA 2 - Perfil cromatográfico do extrato de própolis produzido no estado do Tocantins em 254 nm (a) e 350 nm (b).

FIGURA 3 - Estruturas dos compostos identificados na própolis vermelha.

FIGURA 4 - Espectro de massas proposto para liquiritigenina (1) obtido por CLAE EM/EM em modo positivo.

FIGURA 5 - Espectro de massas proposto para calicosina (2) obtido por CLAE EM/EM em modo positivo.

FIGURA 6 - Espectro de massas proposto para vesticarpano (3) obtido por CLAE EM/EM em modo positivo

FIGURA 7 - Espectro de massas proposto para retusapurpurina B (3) obtido por CLAE EM/EM em modo positivo

FIGURA 8 - Espectro de massas proposto para 3,4-dihidroxi-9-metoxi-pterocarpano (5) obtido por CLAE EM/EM em modo positivo

FIGURA 9 - Espectro de massas proposto para 3-hidroxi-8,9-dimetoxi-pterocarpano (6) obtido por CLAE EM/EM em modo positivo

FIGURA 10 - Espectro de massas proposto para mucronulatol (7) obtido por CLAE EM/EM em modo positivo

FIGURA 11 - Espectro de massas proposto para formononetina (8) obtido por CLAE EM/EM em modo positivo

FIGURA 12 - Espectro de massas proposto para isoliquiritigenina (9) obtido por CLAE EM/EM em modo positivo

FIGURA 13 - Espectro de massas proposto para vestitol (10) obtido por CLAE EM/EM em modo positivo

FIGURA 14 - Espectro de massas proposto para biochanina A (11) obtido por CLAE EM/EM em modo positivo

FIGURA 15 - Espectro de massas proposto para medicarpina (12) obtido por CLAE EM/EM em modo positivo

FIGURA 16 - Espectro de massas proposto para liquiritigenina (1) obtido por CLAE EM/EM em modo negativo

FIGURA 17 - Espectro de massas proposto para calicosina (2) obtido por CLAE EM/EM em modo negativo

FIGURA 18 - Espectro de massas proposto para vesticarpano (3) obtido por CLAE EM/EM em modo negativo

FIGURA 19 - Espectro de massas proposto para retusapurpurina B (4) obtido por CLAE EM/EM em modo negativo

FIGURA 20 - Espectro de massas proposto para mucronulatol (7) obtido por CLAE EM/EM em modo negativo

FIGURA 21 - Espectro de massas proposto para formononetina (8) obtido por CLAE EM/EM em modo negativo

FIGURA 22 - Espectro de massas proposto para isoliquiritigenina (9) obtido por CLAE EM/EM em modo negativo

FIGURA 23 - Espectro de massas proposto para vestitol (12) obtido por CLAE EM/EM em modo negativo

TABELA 1 - Frequência de tipos polínicos para amostras de própolis vermelha

TABELA 2 - Identificação de composto fenólicos no extrato hidroalcoólico de própolis vermelha do Tocantins

CAPITULO III

FIGURA 1 - Cromatogramas dos extratos hidroalcoólicos de própolis vermelha

FIGURA 2 - Atividade leishmanicida de EHP. Concentração Inibitória 50% (A), Concentração Inibitória 90% (B) e Concentração inibitória 50% de frações do extrato de própolis vermelha (EHP-01) (C).

FIGURA 3 - Citotoxicidade de extrato EHP-01 e fração clorofórmica de própolis vermelha

TABELA 1 - Concentração do teor de fenólicos e flavonoides totais de extratos hidroalcoólicos de própolis vermelha

TABELA 2 - Concentração do teor de fenólicos e flavonoides totais das frações obtidas a partir do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha EHP-01

TABELA 3 - Atividade leishmanicida de extratos hidroalcoólicos de própolis vermelha e frações contra formas promastigota de *L. amazonensis*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2. 1 <i>APIS MELLIFERA</i>	14
2. 2 PRÓPOLIS VERMELHA	15
2. 3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA PRÓPOLIS VERMELHA.....	17
2. 4 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA PRÓPOLIS VERMELHA	18
2. 5 LEISHMANIOSE.....	21
3 OBJETIVOS.....	26
3. 1 OBJETIVO GERAL	26
3. 2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
4 CAPITULO I.....	27
5 CAPITULO II.....	46
6 CAPITULO III	75
CONSIDERAÇÕES FINAIS	91
REFERÊNCIAS	92