
A PRÓPOLIS NO COMBATE

A TRIPANOSSOMATÍDEOS DE IMPORTÂNCIA MÉDICA:

UMA PERSPECTIVA TERAPÊUTICA

PARA DOENÇA DE CHAGAS E LEISHMANIOSE

Lívio César Cunha, ¹ Lariza Darlene Santos Alves, ² Lorena Citó Lopes Resende Santana, ¹ Geandra Batista Lima Nunes ³ e Pedro José Rolim Neto ²

RESUMO

Protozooses tais como leishmaniose e doença de Chagas, consideradas doenças negligenciadas, afetam milhões de pessoas em todo o mundo, por isso são constantes as pesquisas para o desenvolvimento de terapias mais eficazes. O interesse pela fitoterapia como fonte alternativa para o tratamento de inúmeras enfermidades tem crescido e merece destaque o uso da própolis, amplamente utilizada na prática médica popular. São atribuídas à própolis, principalmente às variedades encontradas no Brasil, diversas propriedades farmacológicas por sua complexa composição. Estudos *in vivo* e *in vitro* com extratos de própolis contra *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* vêm sendo realizados nos últimos anos com resultados promissores, embora sejam necessários estudos complementares. Este trabalho traz uma revisão sobre os aspectos clínicos e epidemiológicos da leishmaniose e doença de Chagas, assim como a aplicabilidade da própolis como um recurso terapêutico eficaz e seguro para o tratamento dessas protozooses.

DESCRITORES: Própolis. Protozooses. Leishmaniose. Doença de Chagas.

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de novos fármacos para o combate das protozooses é objeto de constantes discussões no meio científico. Os fármacos atualmente disponíveis para o combate de doenças como a leishmaniose e a doença de

- 1 Núcleo de Tecnologia Farmacêutica (NTF), Departamento de Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Piauí (UFPI).
- 2 Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos (LTM), Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).
- 3 Programa de Pós-Graduação de Enfermagem, UFPI.

Endereço para correspondência: Pedro José Rolim Neto, Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos (LTM), Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco. Av. Prof. Arthur de Sá, s/n. CEP 50714-521. Cidade Universitária, Recife, PE, Brasil. E-mail: pedro.rolim@pq.cnpq.br

Recebido para publicação em: 4/1/2010. Revisto em: 13/1/2011. Aceito em: 11/5/2011.

Chagas são pouco eficazes, pois se limitam às formas agudas da doença e, por sua toxicidade, podem causar efeitos colaterais, às vezes graves (Gelb & Hol, 2002).

No caso da doença de Chagas, causada por *Trypanosoma cruzi*, a terapia é limitada a dois nitroheterocíclicos: o benznidazol (Rochagan® ou Radanil®), lançado na década 1970 e o único fármaco atualmente amplamente disponível para o tratamento específico desta doença, e o nifurtimox (Lampit®), introduzido na década de 1960 para o tratamento na fase aguda. Este, restritamente utilizado no Brasil, é empregado como alternativa apenas em caso de intolerância ao benznidazol (Barrett et al., 2003).

Na quimioterapia da leishmaniose, são utilizados os antimoniais pentavalentes como fármacos de primeira escolha (Rath et al., 2003). Em países de língua francesa, espanhola e no Brasil, o fármaco mais utilizado é o antimoniato de meglumina (Glucantime®) (Soares-Bezerra et al., 2004). Também são utilizados como alternativas nos casos de resistência aos antimoniais a pentamidina, a anfotericina B, a paromomicina e o miltefosine (Rath et al., 2003). Contudo, estes não possuem um índice terapêutico tão favorável e também apresentam importantes reações adversas (Silva-López, 2010). Logo, a elevada toxicidade, os custos e a resistência associada aos tratamentos disponíveis fazem com que seja crescente a busca por novas substâncias que possam ser utilizadas na terapia, especialmente aquelas obtidas de fontes naturais (Barrett & Gilbert, 2002).

Neste sentido, a própolis, um produto resinoso produzido pelas abelhas a partir de diversas fontes vegetais, vem sendo amplamente empregada na medicina popular e atrai muita atenção por suas utilidades na prática médica e cosmética graças às suas propriedades antifúngicas (Ota et al., 2001; Dota et al., 2010), antibacterianas (Gonsales et al., 2006; Scazzocchio et al., 2006), antioxidantes (Isla et al., 2001; Kumazawa et al., 2004), antivirais (Vynograd et al., 2000) e antiprotozoárias (Pontin et al., 2008) divulgadas em diversos trabalhos científicos. Há até mesmo estudos sobre sua eficácia contra o vírus da aids (Ito et al., 2001). As dezenas de atividades biológicas e o alto valor agregado atribuído à própolis justificam o interesse global das pesquisas a ela relacionadas (Pereira et al., 2002).

No Brasil, existem muitas plantas que as abelhas utilizam como fonte na produção da própolis e, dependendo da localização geográfica, a composição química pode variar, resultando numa mistura complexa de compostos bioativos e diversas propriedades biológicas (Gonsales et al., 2006).

Estudos com a utilização de amostras de própolis coletadas em diferentes regiões do Brasil e em outros países, realizados com o objetivo de determinar o efeito de extratos com diferentes tipos de própolis contra *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania*, vêm apresentando resultados promissores para o tratamento da doença de Chagas e da leishmaniose. Estas doenças, negligenciadas em razão do pouco interesse para a indústria farmacêutica, necessitam de alternativas terapêuticas eficazes e menos tóxicas (Salomão et al., 2008; Machado et al., 2007).

Este trabalho teve como objetivo fazer um levantamento dos principais estudos *in vivo* e *in vitro* que indicam a utilização promissora da própolis na terapêutica, visando modificar o curso clínico dessas doenças no cenário da saúde pública mundial.

DOENÇA DE CHAGAS

Aspectos clínicos e epidemiológicos

A doença de Chagas, descrita em 1909 pelo médico Carlos Chagas, é uma enfermidade de caráter crônico exclusiva do continente americano, causada por *Trypanosoma cruzi*, um protozoário flagelado da família *Trypanosomatidae*, cuja principal via de transmissão é a vetorial seguida das vias sanguínea (transfusão), vertical (placentária), oral e acidental (Oliveira et al., 2008).

Na América Latina, a transmissão de *Trypanosoma cruzi* tem sido progressivamente reduzida por uma série de iniciativas multinacionais, coordenadas pela Organização Pan-Americana da Saúde (Schofield et al., 2006). A prevalência global da doença foi reduzida a partir de 1990, quando a incidência anual era de 300.000 com um total de 16 a 18 milhões de casos. Em 2007, os números citados foram de 50.000 novos casos por ano e um total de 9,8 milhões de infectados, com 14.000 mortes relacionadas a complicações da doença (Develoux et al., 2009; Soares-Sobrinho et al., 2007), o que demonstra a tendência mundial de diminuição de casos.

Neste sentido, podemos citar o Uruguai e o Chile que foram declarados formalmente livres da transmissão vetorial da doença de Chagas em 1997 e 1999, respectivamente (Dias et al., 2002). No Brasil, o Ministro da Saúde recebeu, no dia 9 de junho de 2006, uma certificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) pela virtual eliminação da transmissão da doença de Chagas pelo principal vetor regional, *Triatoma infestans* (Fiocruz, 2011).

A significativa redução nas taxas de infestação é frequentemente acompanhada pelo combate de seu vetor. Esse fato fica bem evidente quando se analisa o quadro dos países andinos e da América Central, nos quais o combate da doença parasitária é menos avançado. Neles, o elevado número de espécies de vetores (Dias et al., 2002) causa uma maior incidência e prevalência da doença na comparação com outros países.

Os triatomíneos, insetos hematófagos da família *Reduviidae*, são os responsáveis pela transmissão vetorial de *Trypanosoma cruzi* (Almeida et al., 2007). Cerca de 141 espécies são conhecidas, mas apenas algumas possuem um papel importante na transmissão para os seres humanos. Nos países do Cone Sul (Brasil, Chile, Argentina, Uruguai, Paraguai e Bolívia), a espécie *Triatoma infestans*, conhecida popularmente como barbeiro, é a predominante e vive em fendas de paredes de barro e coberturas de palha ou sapé, de forma que as áreas rurais se caracterizam como o principal *habitat* desta espécie (Develoux et al., 2009).

Vários mamíferos silvestres e animais domésticos são considerados reservatórios e hospedeiros definitivos no ciclo do protozoário. No ciclo silvestre, os gambás, tatus, roedores e morcegos são os principais animais reservatórios. No ciclo doméstico, o cão é o mamífero mais afetado, seguido de gatos, ratos, cobaias e coelhos (Almeida et al., 2007; Develoux et al., 2009).

O ciclo de vida do protozoário envolve a passagem obrigatória pelos vertebrados (mamíferos) e invertebrados (triatomíneos). No sangue dos vertebrados, o *Trypanosoma cruzi* se apresenta sob a forma de tripomastigota e, nos tecidos, como amastigotas. Nos invertebrados (insetos vetores), ocorre um ciclo com a transformação dos tripomastigotas sanguíneos em epimastigotas, que depois se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos, que são as formas infectantes acumuladas nas fezes do inseto (Figura 1) (Coura & Castro, 2002).

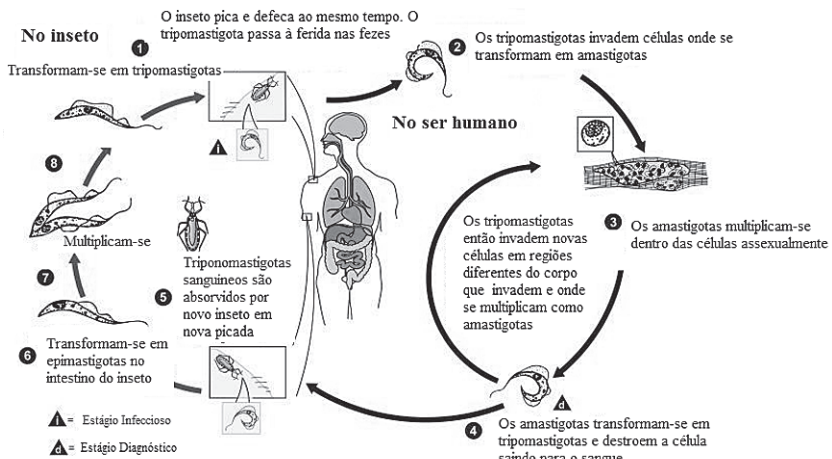


Figura 1. Ciclo da doença de Chagas.

A infecção tem duas fases clínicas bem distintas. Após a contaminação, ocorre a fase aguda da doença que se desenvolve em, aproximadamente, 10% dos indivíduos infectados. O quadro é caracterizado por estado febril prolongado, cefaleia, artralgia, adenomegalia, hepatoesplenomegalia, *rash* cutâneo e edema (Gascón et al., 2007). Também pode ser observado o sinal de Romaña e o chagoma de inoculação, que aparecem de sete a dez dias após a infecção e permanecem por cerca de dois a quatro meses (Oliveira et al., 2008).

Após essa etapa, o paciente não tratado passa para a fase crônica que apresenta várias formas clínicas, dentre elas a cardíaca (20 a 30% dos infectados) e a digestiva (cerca de 10%), que também podem ocorrer associadas. É possível que aconteçam também algumas manifestações neurológicas, em geral pouco citadas por acometerem menos de 5% dos pacientes. Essas manifestações, de maneira geral, são

precedidas por um longo período de latência, o qual é denominado de forma clínica indeterminada. Esta é tida como a forma predominante da fase crônica e o paciente pode permanecer sem nenhum tipo de manifestação clínica durante toda a vida. Este aspecto torna o diagnóstico clínico difícil, contudo os testes sorológicos geralmente são positivos (Hueb & Loureiro, 2005; Gascón et al., 2007; Oliveira et al., 2008).

Com a determinação do ciclo do parasito e das principais manifestações clínicas, o objetivo principal do tratamento da doença de Chagas é basicamente a erradicação da infecção e a prevenção do aparecimento de lesões em órgãos ou do agravamento de lesões presentes (Oliveira et al., 2008). Os medicamentos utilizados atualmente para a erradicação do parasito possuem diversas limitações, conforme foi referido anteriormente. Dentre elas, podemos citar a toxicidade que causa variados efeitos adversos e uma baixa atividade antiparasitária na forma crônica da doença (Urbina & Docampo, 2003). Apesar de o benznidazol ter demonstrado ação no sentido de prevenir o desenvolvimento de cardiopatia chagásica crônica severa, ele não elimina os parasitos completamente, conforme relatado num estudo realizado *in vivo* em camundongos e humanos na fase crônica da infecção (Garcia et al., 2005; Viotti et al. 2006).

Em razão das características físico-químicas e farmacológicas dos fármacos benznidazol e nifurtimox, diversas pesquisas vêm sendo desenvolvidas na busca por novas alternativas terapêuticas (Soares-Sobrinho et al., 2007; Oliveira et al., 2008; Soeiro et al., 2009). Nelas está incluída a síntese de novos fármacos sintéticos (Moreira et al., 2009) como a arylimidamide DB766, que comprovou possuir uma forte atividade tripanocida (*in vitro* e *in vivo*) e excelente seletividade para tripomastigotas sanguíneos e amastigotas intracelulares (Batista et al., 2010).

Embora muitos compostos com atividade tripanocida tenham sido testados durante as últimas décadas, apenas o alopurinol e um limitado número de azoles, como intraconazol, fluconazol e cetoconazol, foram testados com limitados resultados em ensaios clínicos (Soeiro et al., 2009). Como exemplo, podemos citar o estudo clínico realizado com 35 indivíduos de áreas endêmicas da Região Central do Brasil na fase crônica da doença. Durante 60 dias em um estudo duplo-cego, 23 dos pacientes receberam o alopurinol (900 mg/d) e 12, o placebo. No final do estudo, os exames parasitológicos positivos (xenodiagnóstico) demonstraram que o alopurinol não foi eficaz na erradicação do *Trypanosoma cruzi* (Rassi et al., 2007).

Mais recentemente, novos derivados triazólicos (posaconazol, ravuconazol, TAK-187) foram testados, apresentando resultados experimentais promissores tanto em animais como em seres humanos (Urbina, 2010). Contudo, esta situação reflete os baixos investimentos feitos nesta área, principalmente pela indústria farmacêutica (Soeiro et al., 2009). O quadro tem se agravado ainda mais porque, em virtude da redução da incidência, o interesse político e os orçamentos operacionais têm decrescido (Schofield et al., 2006).

Logo, visando contornar o baixo investimento na pesquisa de novas moléculas e aproveitar o elevado potencial da biodiversidade brasileira, muitas

pesquisas estão voltadas para avaliar a atividade de substâncias como quinonas, flavonoides, alcaloides, terpenos e xantonas encontradas em diferentes plantas contra as diferentes formas do parasito. Muitas delas revelam ser caminhos promissores na busca por protótipos de fármacos eficazes para a prevenção e o tratamento da doença de Chagas (Soares-Sobrinho et al., 2007).

LEISHMANIOSE

Aspectos clínicos e epidemiológicos

No Brasil, a leishmaniose está inserida no grupo epidemiológico de doenças transmissíveis com quadro de persistência, uma vez que mantém elevada prevalência e expande sua área de ocorrência em associação com as alterações ambientais e o deslocamento populacional (Brasil, 2005). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a leishmaniose é considerada uma antroponose e integra o conjunto das seis doenças tropicais mais importantes no Velho Mundo e nas Américas (Silva et al., 2008). Nos últimos 20 anos, vem ocorrendo um aumento do número de casos e a ampliação de sua ocorrência geográfica. Atualmente é encontrada em vários estados brasileiros, sob diferentes perfis epidemiológicos (Camargo & Basano, 2004).

O gênero *Leishmania* compreende cerca de 20 espécies diferentes, pertencentes à família Trypanosomatidae, a mesma do *Trypanosoma cruzi*, sendo transmitida de animais silvestres ou domésticos para o homem por meio da fêmea do mosquito hematófago *Phlebotominae* do gênero *Lutzomyia* (Davidson, 2005; Camargo & Barcinski, 2003).

As três principais manifestações da leishmaniose são: a) visceral ou Calazar, causada principalmente por *L. donovani* ou por *L. infantum* e *L. chagasi*. Esta se caracteriza por febre irregular, perda de peso, hepatoesplenomegalia e anemia; b) mucocutânea, causada principalmente pela *L. braziliensis* e pela *L. mexicana*, manifesta lesões que destroem parcial ou totalmente a mucosa nasal e oral, gerando deformidades; c) cutânea, causada geralmente por *L. tropica* e *L. major*, é caracterizada por lesões ulcerativas em áreas expostas. No Brasil, também pode ser causada pela *L. braziliensis* e *amazonensis* (Soares-Bezerra et al., 2004). Essas duas últimas manifestações são classificadas como leishmaniose tegumentar (Silva-López, 2010).

Estima-se que a leishmaniose apresente a prevalência de 12 milhões de casos no mundo e 350 milhões de pessoas estão ameaçadas de contrair a doença em 88 países, 72 dos quais são subdesenvolvidos (Camargo & Barcinski, 2003; WHO, 2008). No mundo, a incidência anual de novos casos é de cerca de 2 milhões, sendo 1,5 milhão de casos de leishmaniose cutânea e 500 mil da leishmaniose visceral. Segundo a OMS, o número de casos de leishmaniose não relatados é aproximadamente cinco vezes maior do que os números oficiais (Silva-López,

2010). No Brasil, encontra-se disseminada em 17 estados das Regiões Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste, sendo pessimistas as previsões para seu controle, mesmo a longo prazo, em virtude de relatos de coinfeções em portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Rath et al., 2003).

A infecção humana é iniciada pela inoculação do parasito, em sua forma promastigota, no sangue humano pela fêmea infectada do flebótomo. Posteriormente, a forma promastigota do parasito é fagocitada para o interior dos macrófagos, dentro se transforma na forma amastigota e se multiplica por divisão binária até o rompimento desses macrófagos. Com esse rompimento, as formas amastigotas se espalham pelo sangue podendo infectar novos macrófagos ou contaminar um novo flebótomo fêmea, quando este fizer a sucção do sangue do vertebrado contaminado. No aparelho digestivo do flebótomo, a forma amastigota transforma-se em seu interior na forma promastigota, reiniciando o ciclo. A doença inicia-se por mecanismos específicos imunes não devidamente estabelecidos. Cães, raposas e roedores também podem servir como reservatórios (Figura 2) (Murray et al., 2005; Gramiccia & Gradoni, 2005).

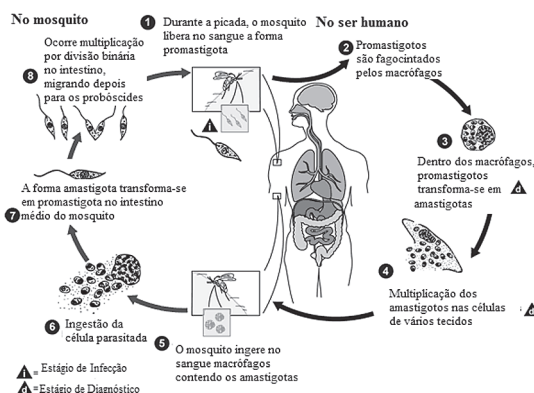


Figura 2. Ciclo da Leishmaniose.

Um conjunto de fatores (espécie, órgão atingido, imunidade) e a capacidade de resposta do paciente são responsáveis pelas diversas formas de leishmaniose citadas e por diferentes manifestações clínicas (Camargo & Barcinski, 2003).

Em teoria, o controle da leishmaniose é possível por meio da interrupção do ciclo de transmissão. São estas algumas das estratégias que podem ser utilizadas para prevenir a transmissão: utilização de inseticidas, proteção individual, eliminação de animais domésticos infectados, detecção e tratamento precoce de casos em humanos. Contudo, as dificuldades no controle se devem em grande parte à diversidade biológica dos parasitos; à existência de muitas espécies de vetores e de mamíferos que podem atuar como fontes de infecção; aos fatores socioeconômicos

das populações afetadas; às diferentes formas clínicas da doença, incluindo aquelas formas graves e resistentes à quimioterapia; ao elevado custo dos medicamentos e sua grande toxicidade para o hospedeiro e, ainda, à inexistência de uma vacina eficaz (Silva-López, 2010).

Com relação à terapêutica, os fármacos antimoniais pentavalentes, frequentemente utilizados como de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses, estão disponíveis nas unidades de saúde. Embora estejam disponíveis, seu potencial hepato, cardio e nefrotóxico e a contraindicação a idosos e grávidas representam sérios obstáculos para a terapêutica (Camargo & Basano, 2004; Mayrink et al., 2006). Além disso, como de modo geral necessitam ser administrados por via parenteral, favorecem o aparecimento de cepas resistentes, o que, em alguns casos, torna os medicamentos obsoletos (Pontin et al., 2008).

Por causa dos problemas relacionados aos fármacos existentes no mercado há mais de 40 anos, a quimioterapia para leishmaniose tem sido objeto de estudo de muitos laboratórios de pesquisa, os quais têm testado outras substâncias químicas e extratos de plantas com a finalidade de encontrar novos agentes leishmanicidas com menores efeitos colaterais e biodisponibilidade adequada (Soares-Bezerra et al., 2004). Também são pesquisadas outras formas farmacêuticas que viabilizem a aplicação desses fármacos, o que tornaria desnecessária a internação do paciente para o tratamento, como é feito atualmente (Ayres et al., 2007).

PRÓPOLIS

A palavra própolis é de origem grega, *pró* significa defesa e *polis* cidade. Este termo genérico é utilizado para denominar o material resinoso e balsâmico coletado e processado pelas abelhas a partir de várias fontes vegetais. As abelhas utilizam a própolis para diversas finalidades: como medida de proteção contra intrusos, para manutenção da temperatura interna e assepsia na colmeia (Salatino et al., 2005; Sousa et al., 2007). As várias substâncias presentes na própolis provêm de flores, ramos, brotos, exsudatos e de outras partes do tecido vegetal. Estas substâncias podem ser modificadas na colmeia pela adição de secreções salivares (Santos et al., 2003).

Sua coloração possui variações de verde, vermelho a marrom. Possui odor característico e apresenta propriedades adesivas por interagir fortemente com óleos e proteínas da pele (Volpi & Bergonzini, 2006). A composição química da própolis é complexa e está relacionada com a flora da região em que foi originada e a época da coleta (Buriol et al., 2009) e, em geral, consiste em ceras, resinas, água, compostos inorgânicos, compostos fenólicos e óleos essenciais (Mohammadzadeh et al., 2007). Também foram descritos ácidos e ésteres alifáticos, ácidos e ésteres aromáticos, açúcares, álcoois, aldeídos, ácidos graxos, aminoácidos, esteroides, cetonas, charconas e di-hidrocharconas, terpenoides, proteínas, vitaminas B1, B2, B6, C, E, assim como diversos minerais (Menezes, 2005). Contudo, sua atividade

farmacológica tem sido comumente atribuída aos compostos fenólicos, entre eles flavonoides e ácidos fenólicos (Buriol et al., 2009), embora suas distintas atividades farmacológicas possam também decorrer do sinergismo entre seus diversos compostos químicos (Menezes, 2005).

Por serem inúmeras as propriedades benéficas da própolis, é amplo seu uso comercial em produtos farmacêuticos, cosméticos e de higiene pessoal na forma de extratos líquidos. Para a elaboração desses produtos, são comumente utilizados extratos obtidos com álcool de cereais a 70% v/v e tempos de extração que variam de 1 dia até 6 meses (Buriol et al., 2009).

Na obtenção de extratos para serem testados em estudos farmacológicos *in vitro* e *in vivo*, distintos solventes são utilizados. Porque solubilizam e extraem diferentes frações dos seus constituintes, causam uma interferência direta nas atividades farmacológicas. O extrato mais comumente utilizado em ensaios biológicos é o etanólico, contudo também são utilizadas diferentes proporções de metanol e água (Sforzin, 2007). Paralelamente também têm surgido outras formas patenteadas que propõem novos métodos de extração da própolis com baixo teor alcoólico ou isentas de álcool. Dentre as alternativas propostas, destaca-se o extrato de própolis obtido com óleo vegetal, que conserva bem suas características organolépticas e possibilita a apresentação do produto em cápsulas gelatinosas. No entanto, esta alternativa apresentou rendimento inferior e menores teores de substâncias fenólicas em comparação com os extratos hidroalcoólicos (Buriol et al., 2009), o que pode interferir diretamente em suas atividades terapêuticas.

Deve-se, portanto, avaliar todos os aspectos críticos do processo extrativo, de modo que sejam otimizadas as diversas condições, tais como: temperatura de extração, comparação entre métodos e diferentes líquidos extratores (álcool em várias diluições, adição de substâncias tensoativas misturadas às soluções álcool-água ou água), entre outras (Longhini et al., 2007).

Outro aspecto importante a ser observado diz respeito à avaliação de amostras de própolis provenientes de diferentes zonas geográficas e climáticas, o que faz com que haja uma variação da composição química e, conseqüentemente, as atividades biológicas podem ser distintas. Logo, ao realizar estudos farmacológicos, não se deve comparar indiscriminadamente amostras de própolis obtidas em diferentes regiões, nem mesmo atribuir uma atividade comprovada em uma determinada amostra a outras obtidas em outras regiões. Por esse motivo, publicações sobre a comprovação de atividades biológicas devem incluir a caracterização físico-química da própolis utilizada (Bankova, 2005). Este aspecto demonstra que, antes de sua utilização, a própolis precisa ser padronizada quimicamente para garantir qualidade, eficácia e segurança e, desse modo, seja possível correlacionar o tipo de própolis com a sua aplicação terapêutica, tarefa imprescindível para um mercado cada vez maior e mais exigente em todo o mundo (Lustosa et al., 2008). O Brasil vem sendo pioneiro nessas práticas, uma vez que é considerado um dos maiores fornecedores de própolis do mundo (Pereira et al., 2002).

Para os diferentes tipos de própolis brasileira são descritas propriedades biológicas e composição química distintas para amostras coletadas em diferentes regiões do país. Os diversos tipos de própolis têm sido, portanto, objeto de intensa investigação ao longo das últimas décadas (Pereira et al., 2002), sendo classificados em 12 grupos, com base na sua origem geográfica, composição química e origem vegetal: cinco da Região Sul, um da Região Sudeste e seis do Nordeste (Daugusch et al. 2008).

Um novo tipo de própolis proveniente da região de mangue do estado de Alagoas teve sua origem botânica identificada como *Dalbergia ecastophyllum*, uma espécie de leguminosa, e foi classificado como o 13º tipo de própolis brasileira (Cabral et al., 2009). Tais achados confirmam a grande biodiversidade brasileira que vem se tornando alvo de diversas pesquisas científicas em todo o mundo (Lustosa et al., 2008).

Paralelamente, há uma menor variação da composição química das própolis encontradas nas regiões temperadas do planeta, onde seus principais compostos bioativos são os flavonoides (Pereira et al., 2002): apigenina, quercetina, hesperetina, rutina, luteolina, genisteína, daidzeína, antocianidina, canferol, entre outros (Menezes, 2005). Apesar de os flavonoides serem os componentes da própolis mais extensivamente estudados, eles não são os únicos responsáveis por suas propriedades farmacológicas. Diversos outros compostos têm sido relacionados às suas propriedades medicinais (Menezes, 2005).

Com relação à própolis brasileira, a mais popular e bem estudada é chamada própolis verde ou Alecrim, que tem origem da *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae), amplamente distribuída nas Regiões Sudeste e Sul do Brasil (Park et al., 2002; Salatino et al., 2005). Neste tipo prevalecem os compostos fenilpropanoides (ácidos cafeícos, ferúlicos, p-cumarínicos e cinâmicos), mas também foi detectada a presença de dehidrocoster lactona, que mostrou exercer várias atividades, inclusive contra o *Trypanosoma cruzi* (Teixeira et al., 2006).

A atividade antibacteriana dessa própolis, coletada em diferentes estados da Região Sudeste, também tem sido amplamente investigada. O estudo realizado com extrato etanólico dessas amostras demonstrou uma grande influência *in vitro* sobre bactérias gram-positivas, independentemente da origem geográfica. Paralelamente, observou-se uma ação limitada em bactérias gram-negativas (Gonsales et al., 2006). Este fato deve-se à constituição dessas bactérias que possuem uma parede celular quimicamente mais complexa e um maior teor lipídico, o que explica sua maior resistência (Vargas et al., 2004). Neste estudo, também se observou uma correlação positiva entre a atividade antibacteriana e o conteúdo de flavonoides (Gonsales et al., 2006).

Na Região Nordeste do país, encontra-se a própolis vermelha, ainda pouco estudada. Esta variedade, recentemente classificada, é relatada como típica de Cuba e da Venezuela, sendo a primeira originada da planta *Clusia nemorosa* (Clusiaceae) e a segunda da *Clusia scrobiculata*. Nesta, foram identificadas 14 substâncias, seis

delas novas para a própolis. Além disso, apenas dois flavanoides (quercetina e crisina) e um ácido fenólico (ácido ferúlico) foram identificados como substâncias normalmente encontradas nas própolis mais estudadas (Trusheva et al., 2006; Silva et al., 2008). A presença de isoflavonas foi observada exclusivamente neste tipo de própolis, sendo atribuídas a esta substância atividades antimicrobianas, antifúngicas e antioxidantes, confirmadas em vários estudos (Alencar et al., 2007; Koo et al., 2000; Hayacibara et al., 2005).

Além dessas atividades mencionadas, também existem relatos de estudos sobre atividades anti-inflamatórias (Mirzoeva & Calder, 1996), antioxidantes (Kumazawa et al., 2004) e antifúngicas (Dota et al., 2010), dentre outras (Lustosa et al., 2008; Menezes, 2005). A primeira dessas atividades é atribuída à presença de ácido cafeico, quercetina, nargenina e do éster fenílico do ácido cafeico, responsáveis pela supressão da síntese de prostaglandinas e de leucotrienos pelos macrófagos. A inibição na geração de óxido nítrico por macrófagos também é apontada como um dos fatores responsáveis pela atividade anti-inflamatória da própolis (Menezes, 2005; Mirzoeva & Calder, 1996).

Diante do potencial apresentado pela própolis, buscou-se levantar os principais estudos que testaram a atividade da própolis contra o *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* sp.

ATIVIDADE DA PRÓPOLIS NAS PROTOZOONOSES

Trypanosoma cruzi

Durante as últimas décadas, houve um aumento nos estudos sobre a composição química, a atividade biológica e os usos terapêuticos da própolis, demonstrando que esta pode ser considerada uma alternativa natural contra a doença de Chagas, já que o tratamento disponível com o benznidazol pode provocar efeitos secundários e sua eficácia para pacientes portadores da fase crônica da doença é questionável por alguns autores (Salomão et al., 2008).

Estudos com a utilização de extrato etanólico da própolis Bulgarian (Et-BLG), administrado por via oral em camundongos infectados na dose de 50mg do extrato/kg, demonstraram uma diminuição da parasitemia e, adicionalmente, da massa do baço. A análise do perfil dos leucócitos no sangue periférico, com base na quantificação das populações das células T, demonstrou essencialmente uma expansão das células CD8. Este resultado sugere a importância dessas células imunológicas na resistência da infecção, por controlar a replicação do *Trypanosoma cruzi* *in vivo* e por ser um importante produtor de interferon- γ . Também não foram observados efeitos hepatotóxicos, nem mesmo em altas dosagens, apresentando uma LD50 maior que 7g/Kg. Adicionalmente, a constituição do extrato etanólico utilizado constatou a presença de 42% de flavanoides e 12% de ácidos fenólicos. Contudo, sugeriu-se que estudos a longo prazo são necessários para confirmar se

o Et-BLG pode ser considerado como um potencial imunomodulador natural que influencie diferentes fases das respostas imunes (Dantas et al., 2006a).

Avaliações da atividade imunomodulatória com amostras de própolis de outras regiões também indicaram um incremento no número de linfócitos CD4 e CD8 em camundongos (Park et al., 2002), bem como o estímulo na produção de anticorpos específicos (Sforcin, 2007), reforçando a hipótese citada.

Outro estudo também foi realizado por Dantas et al. (2006b) utilizando extratos etanólicos (Et-BLG) e cetônicos (Cet-BLG) da própolis Bulgarian, de composição química determinada, do estado de Minas Gerais. O tratamento das células musculares esqueléticas infectadas por *Trypanosoma cruzi* com Et-BLG levou a uma diminuição da infecção e da proliferação da forma amastigota intracelular com um $IC_{50}/24h$ de $36,4 \pm 4,9 \mu\text{g/mL}$, enquanto o $IC_{50}/24h$ do Cet-BLG foi de $39,5 \pm 8,2 \mu\text{g/mL}$, constatando-se que os extratos apresentaram atividades positivas. Danos às células do hospedeiro foram observados apenas na concentração 12,5 vezes maior do que aquelas que afetam o parasito.

A análise ultraestrutural do efeito de ambos os extratos nas formas epimastigotas revelou que os principais alvos foram a mitocôndria e os reservosomos, o efeito incluiu a rarefação da matriz e o aumento de volume da organela. O Et-BLG também afetou o complexo cinetoplasto-mitocôndria nos tripomastigotas, sugerindo que essas organelas sejam o principal local de ação da própolis Bulgarian. Esse fato pode ser confirmado, uma vez que, na concentração de $100 \mu\text{g/mL}$, o Et-BLG demonstrou um efeito mais pronunciado do que o fármaco controle benznidazol (Dantas et al., 2006b), utilizado como fármaco de escolha na doença de Chagas. Logo, a comparação entre o efeito direto do Et-BLG contra as três formas do parasito mostrou que a forma amastigota derivada da cultura de tecidos é mais sensível do que as formas epimastigotas (Prytyk et al., 2003) e tripomastigotas (Salomão et al., 2008).

Paralelamente, realizou-se um estudo utilizando extratos etanólicos com própolis colecionadas de diferentes regiões do Brasil com o objetivo de verificar efeitos antimicrobianos e a atividade contra *T. cruzi*, associando a composição química das amostras analisadas. Os resultados encontrados associam o efeito tripanossomicida à presença do ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico e do 2,2-dimetil-6-carboxietenil-2H-1-benzopiran, sendo encontrado um IC_{50} entre 200–2.000 $\mu\text{g/mL}$ nos extratos estudados (Salomão et al., 2008; Soeiro et al., 2009).

Além da variação da atividade da própolis relacionada à diversidade da composição química dos extratos, em razão dos variados tipos de própolis e solventes utilizados para a extração, observa-se que o processo de obtenção desses extratos também interfere na atividade biológica. Cunha et al. (2004) confirmam essa interferência, pois verificaram uma diminuição da atividade tripanocida em virtude da diminuição das substâncias bioativas do extrato etanólico obtido por refluxo em Soxhlet, quando comparado à maceração em temperatura ambiente. Esta última

mostrou ser mais indicada, uma vez que as substâncias foram melhor preservadas, o que garantiu uma atividade mais elevada contra a forma tripomastigota de *T. cruzi* *in vitro* (Cunha et al., 2004).

De acordo com os resultados analisados nos trabalhos relatados, pode-se considerar a própolis como um potencial agente contra *T. cruzi*, além da possibilidade de um esquema que associe própolis a baixas doses de benzimidazol, o que poderia resultar num controle da infecção e redução dos efeitos colaterais tóxicos com a utilização de uma fonte natural como alternativa para o tratamento da doença de Chagas (Dantas et al., 2006a). Contudo, são necessários mais estudos *in vivo* que confirmem essas perspectivas.

Leishmania sp.

Muitas plantas estão sendo potencialmente estudadas por possuírem atividades biológicas para tratar diversas doenças. Neste sentido, há uma busca por substâncias que conduzam à síntese de uma nova classe de fármaco para a quimioterapia anti-*Leishmania*. Existem relatos de alguns compostos naturais encontrados sobretudo em plantas da América do Sul e da África com essa propriedade (Carvalho & Ferreira, 2001). A própolis, como um produto essencialmente de origem vegetal, também demonstra ser potencialmente eficaz contra essa protozoonose e até mesmo já existe depósito de patente para o uso da própolis com esta finalidade (Ayres et al., 2006).

Testes realizados *in vitro* demonstraram a eficácia da própolis brasileira verde, coletada dos estados do Paraná e Minas Gerais, e da própolis vermelha, coletada do estado de Alagoas, como agentes antiprotozoários. Seus efeitos em culturas de macrófagos infectados pela *Leishmania amazonensis* foram observados em algumas horas. Nesse estudo, observou-se uma redução da carga parasitária por intermédio do monitoramento da porcentagem de células infetadas e do número de parasitos intracelulares. A própolis vermelha, contendo elevada concentração de prenilados e benzofenonas, mostrou ser um extrato mais ativo que as própolis verdes amostradas, pois inibiu a proliferação celular da forma amastigota e não apresentou toxicidade para as culturas de macrófagos, levando a uma redução de 84,5% do nível de infecção na concentração de 6 µg/mL. Este efeito demonstrou ser proporcional e dependente da concentração e do tempo de exposição ao extrato. Contudo, o extrato não apresentou efeito direto nas formas promastigota e amastigota extracelulares, sugerindo que os constituintes da amostra de própolis vermelha intensificam o mecanismo de ativação dos macrófagos levando à morte de *L. amazonensis*. Os resultados promissores obtidos por meio deste estudo com a utilização de extratos etanólicos de própolis brasileira incentivam novos estudos com modelos animais (Ayres et al., 2007).

Pontin et al. (2008) também realizaram um estudo para verificar a atividade *in vitro* do extrato hidroalcoólico de própolis verde brasileira para as

formas promastigota de *Leishmania braziliensis*, (nas doses de 1 a 750 mg mL⁻¹) e amastigota (10, 100 e 250 mg mL⁻¹) em comparação com o grupo controle dos testes positivo (anfotericina B) e negativo (dimetilsulfóxido a 1% em solução fisiológica). O extrato mostrou-se ativo para a forma promastigota e inativo para a amastigota, proporcionando a morte de 79,3% dos parasitos na concentração de 500 µg/mL e um IC₅₀ de 18,13 µg/mL, que foi calculado por regressão não linear da curva dose-resposta obtida. O ensaio de citotoxicidade *in vitro* não mostrou efeito nas concentrações máximas testadas. Paralelamente, a análise realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) permitiu a identificação do ácido cafeico, ácido p-cumárico, aromadendrine-4'-metil-éter, ácido 3-prenil-p-cumárico e ácido 3,5-diprenil-p-cumárico como principais compostos do extrato testado.

No ensaio *in vivo*, foi utilizada uma linhagem de camundongos machos *Mus musculus*, tratados com o extrato da própolis verde por via oral (grupo 1), tópica (grupo 2), oral e tópica (grupo 3), e glucantime (grupo 4), utilizando NaCl 0,9% (grupo 5) com controle negativo. Os grupos 1, 2 e 3 exibiram uma diminuição da lesão em desenvolvimento, após 90 dias de tratamento, em 78,6%, 84,3% e 90,0%, respectivamente; o grupo tratado com glucantime apresentou 57,7% de diminuição, todos em comparação com os grupos de controle negativo. Este foi o primeiro relato da atividade *in vivo* antileishmanial para própolis verde brasileira (Pontin et al., 2008).

Acredita-se que a atividade *in vivo* do extrato da própolis brasileira esteja, em parte, relacionada à ativação macrofágica (Orsin et al., 2000). Essa atividade pode estar ligada à presença de derivados do ácido cafeoilquinico, que intensificam a propagação e a motilidade dos macrófagos, sugerindo que a própolis esteja associada à atividade imunestimulatória. Ocorre também a estimulação da síntese de óxido nítrico pelos macrófagos, o que os torna mais sensíveis ao estímulo de substâncias como o interferon- γ , importante para a resposta imunológica (Orsin et al., 2000). Além disso, deve-se também levar em consideração a atividade antimicrobiana e anti-inflamatória da própolis, importante sobretudo na ação tópica do extrato, o que demonstra que a associação das vias tópica e oral é mais eficiente na ação anti-*Leishmania* (Pontin et al., 2008).

Em outro estudo realizado comparou-se a composição química dos extratos etanólico e cetônico da própolis Bulgarian e do extrato etanólico da própolis brasileira (Et-BRA) (do estado de Minas Gerais), assim como sua ação contra a forma promastigota em diferentes espécies de *Leishmania* (Machado et al., 2007). De acordo com os resultados obtidos, os extratos etanólico (Et-BLG) e cetônico (Cet-BLG) da própolis Bulgarian apresentaram atividades semelhantes, seguindo a seguinte ordem de suscetibilidade: *L. major* > *L. amazonensis* > *L. chagasi* > *L. braziliensis*. Em relação à composição desses extratos, no etanólico houve predominância de flavanoides correspondendo a 35,9% do total, enquanto no cetônico a diferença refere-se aos níveis elevados de monossacarídeos.

Para o extrato etanólico da própolis brasileira, *L. major*; *L. chagasi* e *L. braziliensis* foram semelhantemente susceptíveis, sendo cerca de três vezes mais ativa contra a *L. braziliensis* que os outros dois extratos; a *L. amazonensis* foi a menos susceptível das espécies. Na composição desse extrato, foi verificado um baixo teor de flavonoides (1,1%), indicando que outros compostos fenólicos, além de flavonoides, também estão envolvidos na atividade leishmanicida (Machado et al., 2007). Os valores de IC₅₀, expressos em mg/mL, para a atividade dos extratos de própolis encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1. Valores de IC₅₀, 1 dia, para a atividade dos extratos de própolis na forma promastigota das diferentes espécies de *Leishmania*

Extrato	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. chagasi</i>	<i>L. major</i>
Et-Blg	29.3 ± 7.6 a	142.2 ± 14.5	53.9 ± 7.3	7.2 ± 1.4
CET-Blg	26.9 ± 6.4	nd	41.3 ± 0.9	2.8 ± 0.3
Et-Bra	229.3 ± 24.2	48.6 ± 3.7	49.9 ± 4.4	48.2 ± 3.6

Legenda. a: média ± desvio padrão de quatro experimentos independentes; nd: não determinado (Adaptado de Machado et al., 2007).

De forma geral, esse estudo demonstrou que, para todas as espécies de *Leishmania* avaliadas, os extratos da própolis Bulgarian foram mais ativos do que o extrato etanólico da própolis brasileira, o que demonstra a necessidade de uma investigação mais detalhada sobre o efeito de cada componente ou de suas combinações sobre cada espécie (Machado et al., 2007).

Estudo recente investigou o efeito da própolis Turca em *Leishmania tropica*. Neste, foram obtidos extratos etanólicos que foram testados *in vitro* na forma promastigota em uma faixa de concentração entre 0,0625 mg/mL e 1,024 g/mL. Os parasitos foram examinados diariamente em microscópio nos tempos de 24, 48, 72 e 96 h, sendo avaliadas sua mobilidade, morfologia e densidade. Com base nos resultados obtidos, observou-se que o extrato inibiu os parasitos a partir da concentração de 32 mg/mL em 24 horas, sendo o efeito leishmanicida aumentado em concentrações e tempos crescentes de exposição, mesmo quando comparado ao controle utilizado (Glutamine®) (Ozbilge et al., 2010).

Portanto, a composição química da própolis é um dos principais fatores a serem investigados quando se pretende avaliar suas atividades farmacológicas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presente revisão forneceu evidências biológicas de que a própolis constitui uma fonte promissora de compostos naturais para o desenvolvimento

de novos agentes quimioterápicos no tratamento de leishmaniose e da doença de Chagas. Além disso, investigações biológicas e fitoquímicas devem ser estimuladas para que o potencial terapêutico dos diferentes tipos de própolis possa ser plenamente utilizado, já que surge como uma alternativa natural ainda não totalmente explorada para o tratamento de diversas enfermidades.

ABSTRACT

Propolis activity against trypanosomatids of medical relevance: a therapeutic perspective for Chagas disease and leishmaniasis

This article presents a review of the basic clinical and epidemiological aspects of leishmaniasis and Chagas disease, as well as the potential utility of propolis, a natural product from bees widely used in popular medicine, for their specific treatment. Infections caused by protozoan parasites are considered neglected diseases and affect millions of people in the world, requiring large efforts on research for the development of safer and more effective therapies. Currently there is great interest in phytotherapy as an alternative approach for the treatment of these diseases. Among these approaches propolis is being actively investigated, based in its previously known antimicrobial activities. Distinct pharmacological activities have been attributed to the different types of propolis, particularly in Brazil. Several studies *in vitro* and *in vivo* with extracts of propolis against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp have had promising results, but further work is required to confirm the potential value of this natural product for the treatment of human infections.

KEY WORDS: Propolis. Parasitic diseases. Leishmaniasis. Chagas disease.

REFERÊNCIAS

1. Alencar SM, Oldoni TLC, Castro ML, Cabral ISR, Costa-Neto CM, Cury JA. A new type of Brazilian propolis: Red propolis. *J Ethnopharmacol* 113: 278-283, 2007.
2. Almeida EA, Barbosa Neto RM, Guariento ME, Wanderley JS, Souza ML. Apresentação clínica da doença de Chagas crônica em indivíduos idosos. *Rev Soc Bras Med Trop* 40: 311-315, 2007.
3. Ayres DC, Marcucci MC, Giorgio S. *Treatment methods of leishmaniasis with Brazilian propolis*. Requested patent. Brazilian National Institute for Intellectual Property, INPI, Nº. PI 018060007317, 01/27/2006.
4. Ayres DC, Marcucci MC, Giorgio S. Effects of Brazilian propolis on *Leishmania amazonensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 215-220, 2007.
5. Bankova V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *J Ethnopharmacol* 100: 114-117, 2005.
6. Barrett MP, Gilbert IH. Perspectives for New Drugs Against Trypanosomiasis and Leishmaniasis. *Curr Top Med Chem* 2: 471-482, 2002.
7. Barrett R, Burchmore AS, Lazzari J, Frasch A, Cazzulo J, Krishna S. The trypanosomiasis. *Lancet* 362: 1469-1480, 2003.

8. Batista DGJ, Batista MM, Oliveira GM, Amaral PB, Vieira JL, Britto CC, Lima AJMM, Romanha AJ, Sales Junior PA, Stephens CE, Boykin DW, Soeiro MNC. Arylimidamide DB766, a potential chemotherapeutic candidate for Chagas' disease treatment. *Antimicrob Agents Chemother* 54: 2940-2952, 2010.
9. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Doenças infecciosas e parasitárias: Guia de bolso*. 6ªed. rev. Brasília, 2005. p.196-202.
10. Buriol L, Finger D, Schmidt EM, Santos JMT, Rosa MR, Quinaia SP, Torres YR, Santa HSZ, Pessoa C, Moraes MO, Costa-Lotufu LV, Ferreira PMP, Sawaya ACHF, Eberlin MN. Composição química e atividade biológica de extrato oleoso de própolis: uma alternativa ao extrato etanólico. *Quím Nova* 32: 296-302, 2009.
11. Cabral ISR, Oldoni TLC, Prado A, Bezerra RMN, Alencar SM, Ikegaki M, Rosalen PL. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. *Quím Nova* 32: 1523-1527, 2009.
12. Camargo LMA, Barcinski, MA. Leishmanioses, feridas bravas e kalazar. *Ciênc Cult* 55: 34-37, 2003.
13. Camargo LMA, Basano AS. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. *Rev Bras Epidemiol* 7: 328-337, 2004.
14. Carvalho PB, Ferreira EI. Leishmaniasis phytotherapy. Nature's leadership against an ancient disease. *Fitoterapia* 72: 599-618, 2001.
15. Coura JR, Castro SLA. Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 3-24, 2002.
16. Cunha IBS, Salomão K, Shimizu M, Bankova VS, Custódio AR, Castro SL, Marcucci MC. Antitrypanosomal Activity of Brazilian Propolis from *Apis mellifera*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 52: 602-604, 2004.
17. Dantas AP, Olivieri BP, Gomes FH, de Castro SL. Treatment of Trypanosoma cruzi-infected mice with propolis promotes changes in the immune response. *J Ethnopharmacol* 103: 187-193, 2006a.
18. Dantas AP, Salomão K, Barbosa HS, De Castro SL. The effect of Bulgarian propolis against *Trypanosoma cruzi* and during its interaction with host cells. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101: 207-211, 2006b.
19. Dausch A, Moraes CS, Fort P, Park YK. Brazilian Red Propolis – Chemical Composition and Botanical Origin. *eCAM* 5: 435-441, 2008.
20. Davidson RN. Leishmaniasis. *Medicine (Baltimore)* 33: 43-46, 2005.
21. Develoux M, Lescure FX, Loup GL, Pialoux G. Maladie de Chagas. Chagas disease. *La Rev med int* 30: 686-695, 2009.
22. Dias JCP, Prata A, Schofield CJ. Doença de Chagas na Amazônia: esboço da situação atual e perspectivas de prevenção. *Rev Soc Bras Med Trop* 35: 669-678, 2002.
23. Dota KFDD, Consolaro MELC, Svidzinski TIE, Bruschi ML. Antifungal Activity of brazilian propolis microparticles against yeasts isolated from vulvovaginal candidiasis. *eCAM* doi:10.1093/ecam/neq029, 2010.
24. Gelb MH, Hol WGJ. Drugs to combat tropical protozoan parasites. *Science* 297: 333-334, 2002.
25. Garcia S, Ramos CO, Senra JFV, Vilasboas F, Rodrigues MM, Campos De Carvalho AC, Santos RR, Soares MBP. Treatment with benznidazole during the chronic phase of experimental Chagas' disease decreases cardiac alterations. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 1521-1528, 2005.
26. Gascón J, Albajar P, Cañas E, Flores M, Prate JG, Herreraf RN, Lafuenteg CA, Luciardif HL, Moncayoh A, Molinai L, Muñoz J, Puentej S, Sanzk G, Treviño B, Sergio-Salles X. Diagnóstico, manejo y tratamiento de la cardiopatía chagásica crónica en áreas donde la infección por *Trypanosoma cruzi* no es endémica. *Rev Esp Cardiol* 60: 285-293, 2007.
27. Gonsales GZ, Orsi RO, Fernandes-Junior A, Rodrigues P, Funari SRC. Antibacterial activity of propolis collected in different regions of Brazil. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis* 12: 276-284, 2006.

28. Gramiccia M, Gradoni L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *Int J Parasitol* 35: 1169-1180, 2005. Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=66>. Acesso em: 30/05/2011.
29. Hayacibara M, Koo H, Rosalen PL, Duarte S, Franco EM, Bowen WH, Ikegaki M, Cury JA. *In vitro* and *in vivo* effects of isolated fractions of Brazilian propolis on caries development. *J Ethnopharmacol* 101: 371-376, 2005.
30. Hueb MFD, Loureiro SR. Revisão: Aspectos Cognitivos e Psicossociais associados a doença de Chagas. *Psicol Estud* 10: 137-142, 2005.
31. Isla MI, Moreno MIN, Sampietro AR, Vattuone MA. Antioxidant activity of Argentine propolis extracts. *J Ethnopharmacol* 76: 165-170, 2001.
32. Ito J, Chang FR, Wang HK, Park YK, Ikegaki M, Kilgore N. Anti-HIV activity of moronic acid derivatives and the new mellifore-related triterpenoid isolated from Brazilian propolis. *J Nat Prod* 64:1278-1281, 2001.
33. Koo H, Rosalen PL, Cury JA, Ambrosano GMB, Murata RM, Yatsuda R, Ikegaki M, Alencar SM, Park YK. Effect of a new variety of *Apis mellifera* propolis on mutants streptococci. *Curr Microbiol* 41: 192-196, 2000.
34. Kumazawa S, Hamasaka T, Nakayama T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chem Toxicol* 84: 329-339, 2004.
35. Longhini R, Raksa SM, Oliveira ACP, Svidzinski TIE, Franco SL. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. *Rev Bras Farmacogn* 17: 388-395, 2007.
36. Lustosa SR, Galindo, AB, Nunes LCC, Randau KP, Rolim-Neto PJ. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. *Braz J Pharmacogn* 18: 447-454, 2008.
37. Machado GMC, Leon LL, Castro SL. Activity of Brazilian and Bulgarian propolis against different species of *Leishmania*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 73-77, 2007.
38. Mayrink W, Botelho ACC, Magalhães PA, Batista SM, Lima AO, Genaro O, Costa CA, Melo MN, Michalick MSM, Williams P, Dias M, Caiaffa WT, Nascimento E, Machado-Coelho GLL. Immunotherapy, immunochemotherapy and chemotherapy for American cutaneous leishmaniasis treatment. *Rev Soc Bras Med Trop* 39:14-21, 2006.
39. Menezes H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. *Arq Inst Biol* 72: 405-411, 2005.
40. Mirzoeva OK, Calder PC. The effect of propolis and its components on eicosanoid production during inflammatory response. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 55: 441-449, 1996.
41. Mohammadzadeh S, Shariatpanahi M, Hamedí M, Ahmadkhaniha R, Samadi N, Ostad SN. Chemical composition, oral toxicity and antimicrobial activity of Iranian propolis. *Food Chem Toxicol* 103: 1097-1103, 2007.
42. Moreira DRM, Leite ACL, Santos RR, Soares MBP. Approaches for the development of new anti-*Trypanosoma cruzi* agents. *Curr Drug Targets* 10: 212-231, 2009.
43. Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet* 366: 1561-1577, 2005.
44. Oliveira MF, Nagao-Dias AT, Pontes VMO, Souza-Júnior AS, Coelho HLL, Coelho ICB. Tratamento etiológico da doença de chagas no Brasil. *Rev Patol Trop* 37: 209-228, 2008.
45. Orsin RO, Funari SRC, Soares AMVC, Calvi SA, Oliveira SL, Sforzin JM, Bankova V. Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis* 6: 205-219, 2000.
46. Ozbilge H, Kaya EG, Albayrak S, Silici, S. Anti-leishmanial activities of ethanolic extract of Kayseri propolis. *Afr J Microbiol Res* 4: 556-560, 2010.
47. Ota C, Unterkircher C, Fantinato V, Shimizu MT. Antifungal activity of propolis on different species of *Candida*. *Mycoses* 44:375-378, 2001.
48. Park KY, Alencar SM, Aguiar CL. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *J Agric Food Chem* 50: 2502-2506, 2002.

49. Pereira AS, Seixas FRMS, Aquino-Neto FR. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. *Quím Nova* 25: 321-326, 2002.
50. Pontin K, Silva-Filho AA, Santos FF, Silva MLA, Cunha WRA, Nanayakkara D, Bastos JK, Albuquerque S. In vitro and in vivo antileishmanial activities of a Brazilian green propolis extract. *Parasitol Res* 103: 487-492, 2008.
51. Prytyk E, Dantas AP, Salomão K, Pereira AS, Bankova VS, De Castro SL, Aquino FR. Flavonoids and trypanocidal activity of Bulgarian propolis. *J Ethnopharmacol* 88: 189-193, 2003.
52. Rassi A, Luquetti AO, Rassi-Jr A, Rassi GG, Rassi SG, Silva IG, Rassi AG. Short Report: specific treatment for *Trypanosoma cruzi*: lack of efficacy of allopurinol in the human chronic phase of Chagas Disease. *Am J Trop Med Hyg* 76: 58-61, 2007.
53. Rath S, Trivelin LA, Imbrunito TR, Tomazela DM, Jesús MN, Marzal PC, Andrade-Junior HF, Tempone AG. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. *Quím Nova* 26: 550-555, 2003.
54. Salatino A, Teixeira EW, Negri I, Message D. Origin and chemical variation of Brazilian própolis. *eCAM* 2: 33-38, 2005.
55. Salomão K, Pereira PRS, Campos LC, Borba CM, Cabello PH, Marcucci MC, Castro SL. Brazilian Propolis: correlation between chemical composition and antimicrobial activity. *eCAM* 5: 317-324, 2008.
56. Santos FA, Bastos EMAF, Maia ABRA, Uzeda M, Carvalho MAR, Farias LM, Moreira ESA. Brazilian propolis: Physicochemical properties, plant origin and antibacterial activity on periodontopathogens. *Phytother Res* 17: 285-289, 2003.
57. Scazzocchio F, D'Auria FD, Alessandrini D, Pantanella F. Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. *Microbiol Res* 161: 327-333, 2006.
58. Schofield CJ, Jannin J, Salvatella R. The future of Chagas disease control. *Trends Parasitol* 22: 583-588, 2006.
59. Sforcin JM. Propolis and the immune system: a review. *J Ethnopharmacol* 113: 1-14, 2007.
60. Silva BB, Rosalen PL, Cury JA, Ikegaki M, Souza VC, Esteves A, Alencar SM. Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of Brazilian propolis. *eCAM* 5 313-316, 2008.
61. Silva-López RE. Proteases de *Leishmania*: novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. *Quím Nova* 33: 1541-1548, 2010.
62. Soares-Bezerra RJ, Leon L, Genestra M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. *Braz J Pharm Sci* 40: 139-149, 2004.
63. Soares-Sobrinho JL, Medeiros FPM, La Roca MF, Silva KER, Lima LNA, Rolim Neto PJ. Delineamento de alternativas terapêuticas para o tratamento da doença de Chagas. *Rev Patol Trop* 36: 103-118, 2007.
64. Soeiro MNC, Dantas AP, Daliry A, Silva CF, Batista DGJ, Souza EM, Oliveira GM, Salomão K, Batista MM, Pacheco MGO, Silva PB, Santa-Rita RM, Barreto RFSM, Boykin DW, Castro SL. Experimental chemotherapy for Chagas disease: 15 years of research contributions from in vivo and in vitro studies. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 301-310, 2009.
65. Sousa JPB, Niede A.J.C. Furtado NAJC, Jorge R, Soares AEE3, Bastos JK. Perfis físico-químico e cromatográfico de amostras de própolis produzidas nas microrregiões de Franca (SP) e Passos (MG), Brasil. *Braz J Pharmacogn* 17: 83-93, 2007.
66. Teixeira ARL, Nitz N, Guimaro MC, Gomes C, Santos-Buch CA. Chagas disease. *J Postgrad Med* 82: 788-798, 2006.
67. Trusheva B, Popova M, Bankova V, Simova S, Marcucci MC, Miorin PL, Pasin FR, Tsvetkova I. Bioactive constituents of brazilian red propolis. *eCAM* 3: 249-254, 2006.
68. Urbina JA. New Insights in Chagas' Disease Treatment. *Drugs Fut* 35: 409-410, 2010.
69. Urbina JA, Docampo R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends Parasitol* 19: 495-501, 2003.
70. Vargas AC, Loguercio AP, Witt NM, Da Costa MM, Sá e Silva M, Viana LR. Atividade antimicrobiana "in vitro" de extrato alcoólico de própolis. *Ciênc Rural* 34: 159-163, 2004.

71. Viotti R, Vigliano C, Lococo B, Bertocchi G, Petti M, Alvarez GM, Postan M, Armenti A. Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. *Ann Intern Med* 144: 724-734, 2006.
72. Vynograd N, Vynograd I, Sosnowski ZA. Comparative multi-centre study of the efficacy of propolis, acyclovir and placebo in the treatment of genital herpes (HSV). *Phytomedicine* 7: 1-6, 2000.
73. Volpi N, Bergonzini G. Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC–electrospray mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 42: 354-361, 2006.
74. World Health Organization - WHO. Disponível em: www.who.int/en/, 2008. Acesso em: 20/01/2008.