

RESUMO EXPANDIDO - DOENÇAS NEGLIGENCIADAS

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL LEISHMANICIDA DA PRÓPOLIS MARANHENSE DE ANAJATUBA IN VITRO/IN VITRO EVALUATION OF THE LEISHMANICIDAL POTENTIAL OF PROPOLIS FROM ANAJATUBA, MARANHÃO, BRAZIL

Marcos Farias Carneiro (marcos.fc@discente.ufma.br)

Jayane Sousa Santos (jayane.sousa@discente.ufma.br)

Tatielle Gomes Dias (tatielle.dias@discente.ufma.br)

Richard Pereira Dutra (richard.dutra@ufma.br)

Aramys Silva Dos Reis (aramys.reis@ufma.br)

INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença negligenciada de distribuição mundial, presente em quase 100 países, em regiões tropicais e subtropicais, acometendo mais de 12 milhões de pessoas. É causada por protozoários do gênero *Leishmania*, transmitidos por flebotomíneos, podendo manifestar-se em diferentes formas clínicas, desde quadros cutâneos até formas viscerais potencialmente fatais (Ruiz-Postigo et al., 2021).

As opções terapêuticas disponíveis, como antimoniais pentavalentes, anfotericina B e miltefosina, apresentam limitações, incluindo elevada toxicidade, altos custos, longos períodos de tratamento e surgimento de cepas resistentes (Pradhan et al., 2022). Nesse cenário, a busca por novas alternativas terapêuticas mais seguras e eficazes torna-se essência.

A própolis se destaca por sua composição química e atividades biológicas. Produzida por abelhas do gênero *Apis*, resulta da mistura de resinas vegetais com secreções enzimáticas e cera, apresentando propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias e antioxidantes (Rufatto et al., 2017).

A diversidade vegetal do Maranhão influencia a composição da própolis, conferindo-lhe características químicas distintas. Assim, a própolis de Anajatuba destaca-se como um recurso promissor para aplicações biotecnológicas e estratégias terapêuticas contra parasitoses.

OBJETIVO

Avaliar a atividade leishmanicida de extratos de própolis maranhense sobre formas promastigotas de *Leishmania amazonense*, in vitro.

MATERIAIS E MÉTODOS

As amostras de própolis foram coletadas em apiários de Anajatuba (MA), higienizadas e refrigeradas. O extrato foi preparado conforme Dutra et al. (2023). Foram analisadas seis amostras de própolis (P1–P6), preparadas na concentração de 50 mg/mL, centrifugadas, filtradas em membrana de 0,22 µm e diluídas para 500 e 50 µg/mL.

A citotoxicidade foi avaliada em GM, cultivados em placas de 96 poços em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 10 µg/mL de penicilina, 10 U/mL de estreptomicina e 0,25 µg/mL de anfotericina B. As células foram tratadas (P1–P6). Após 2 horas, as placas foram incubadas a 37 °C em atmosfera contendo 5% de CO₂. O controle negativo consistiu de células cultivadas em meio de cultura. A viabilidade celular pelo ensaio de MTT, sendo os experimentos realizados em triplicata (NETO et al., 2022).

A atividade leishmanicida foi avaliada em promastigotas de *Leishmania amazonensis*, cultivadas em meio Schneider suplementado com SFB e gentamicina (50 µg/mL). As amostras (P1–P6) foram testadas nas mesmas concentrações do ensaios citotóxico. As culturas foram tratadas com 50 µL das diluições do extrato e 50 µL da suspensão parasitária. O controle positivo foi realizado com anfotericina B (5 µg/mL), enquanto o controle negativo consistiu em meio de cultura e parasitos. Após 24 horas, a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT. Após 3 horas de incubação com MTT, protegido da luz, os cristais foram solubilizados com SDS e a absorbância foi medida a 550 nm em leitor de microplacas (Biotek Elx800, Winooski, VT, EUA).

A análise estatística foi realizada no GraphPad Prism, adotando-se nível de significância de 5%, por meio do ANOVA, seguida do pós-teste de Tukey.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve redução significativa da viabilidade de promastigotas após exposição aos extratos de própolis ($p < 0,05$), com efeito dependente da concentração e maior atividade em 500 µg/mL. As amostras foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP), P1 (50µg: 5.11 $\pm$ 1.95; 500µg: 3.28 $\pm$ 3.07) , P2 (50µg: 9.59 $\pm$ 6.77; 500µg: 2.88 $\pm$ 2.82), P5 (50µg: 5.60 $\pm$ 1.74; 500µg: 4.56 $\pm$ 2.69) e P6 (50µg: 10.33 $\pm$ 2.56; 500µg: 7.46 $\pm$ 2.60) apresentaram maior atividade leishmanicida, enquanto P3(50µg: 22.29 $\pm$ 20.37; 500µg: 6.30 $\pm$ 2.67) e P4 (50µg: 27.05 $\pm$ 24.21; 500µg: 9.98 $\pm$ 0.75) exibiram efeito moderado.

A citotoxicidade em GM também foi dependente da concentração: em 50 µg/mL, P1(50µg: 74.03 $\pm$ 5.50; 500µg: 2.11 $\pm$ 0.50), P4(50µg: 90.08 $\pm$ 3.02; 500µg: 4.23 $\pm$ 2.58) e P6 (50µg: 87.08 $\pm$ 5.08; 500µg: 15.07 $\pm$ 0.22)apresentaram baixa toxicidade, P2(50µg: 50.26 $\pm$ 5.60; 500µg: 2.37 $\pm$ 0.54) e P3(50µg: 53.08 $\pm$ 3.51; 500µg: 2.02 $\pm$ 0.24) efeito intermediário e P5(50µg: 36.53 $\pm$ 6.52; 500µg: 3.09 $\pm$ 0.44) maior citotoxicidade; em 500 µg/mL, todas reduziram acentuadamente a viabilidade celular.

A análise indica melhor seletividade para P1 e P6, enquanto P5, apesar da elevada atividade antiparasitária, apresentou maior toxicidade. A variabilidade entre as amostras pode estar relacionada à composição química da própolis,

compostos fenólicos e flavonoides, associados à atividade antiparasitária (Ribeiro et al., 2023).

CONCLUSÃO

Os resultados indicam que extratos de própolis de *Apis mellifera* de Anajatuba-MA apresentam atividade citotóxica frente a promastigotas de *Leishmania amazonensis*. A própolis é promissora para estratégias antiparasitárias, possivelmente devido a metabólitos bioativos, reforçando a importância da biodiversidade maranhense. Estudos adicionais são necessários para avaliar eficácia, segurança e potencial de uso.

INTRODUCTION

Leishmaniasis is a neglected disease with worldwide distribution, occurring in nearly 100 countries across tropical and subtropical regions and affecting more than 12 million people. It is caused by protozoan parasites of the genus *Leishmania*, transmitted by phlebotomine sand flies, and can manifest in different clinical forms, ranging from cutaneous lesions to potentially fatal visceral disease (Ruiz-Postigo et al., 2021).

Available therapeutic options, including pentavalent antimonials, amphotericin B, and miltefosine, have important limitations, such as high toxicity, elevated costs, prolonged treatment, and the emergence of drug-resistant strains (Pradhan et al., 2022). Therefore, the search for safer and more effective therapeutic alternatives remains essential.

Propolis is notable for its chemical composition and biological activities. Produced by *Apis* bees, it consists of plant resins mixed with wax and enzymatic secretions and exhibits antimicrobial, anti-inflammatory, and antioxidant properties (Rufatto et al., 2017).

The plant diversity of Maranhão influences the composition of propolis, resulting in distinct chemical characteristics. Thus, propolis from Anajatuba represents a promising resource for biotechnological applications and therapeutic strategies against parasitic diseases.

OBJECTIVE

To evaluate the in vitro leishmanicidal activity of propolis extracts from Maranhão against promastigote forms of *Leishmania amazonensis*.

MATERIALS AND METHODS

Propolis samples were collected from apiaries in Anajatuba, Maranhão, Brazil, cleaned, and refrigerated. Extracts were prepared according to Dutra et al. (2023). Six propolis samples (P1–P6) were analyzed. The extracts were prepared at a concentration of 50 mg/mL, centrifuged, filtered through a 0.22 µm membrane, and diluted to 500 and 50 µg/mL.

Cytotoxicity was evaluated in GM cells cultured in 96-well plates containing DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin (10 µg/mL), streptomycin (10 U/mL), and amphotericin B (0.25 µg/mL). Cells were treated with samples P1–P6. After 2 h, plates were incubated at 37 °C in an atmosphere containing 5% CO₂. Untreated cells cultured in medium served as the negative control. Cell viability was determined using the MTT assay, and all experiments were performed in triplicate (Neto et al., 2022).

Leishmanicidal activity was evaluated against *Leishmania amazonensis* promastigotes cultured in Schneider's medium supplemented with FBS and gentamicin (50 µg/mL). Samples P1–P6 were tested at the same concentrations used in the cytotoxicity assay. Cultures were treated with 50 µL of extract dilution and 50 µL of parasite suspension. Amphotericin B (5 µg/mL) was used as the positive control, while culture medium containing parasites served as the negative control. After 24 h, viability was determined using the MTT assay. Following 3 h of incubation with MTT protected from light, the crystals were solubilized with SDS, and absorbance was measured at 550 nm using a microplate reader (Biotek ELx800, Winooski, VT, USA).

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism software. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test, adopting a significance level of 5%.

RESULTS AND DISCUSSION

Exposure to propolis extracts significantly reduced promastigote viability ($p < 0.05$), with a concentration-dependent effect and greater activity at 500 $\mu\text{g/mL}$. Results are expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD). Samples P1 (50 μg : 5.11 ± 1.95 ; 500 μg : 3.28 ± 3.07), P2 (50 μg : 9.59 ± 6.77 ; 500 μg : 2.88 ± 2.82), P5 (50 μg : 5.60 ± 1.74 ; 500 μg : 4.56 ± 2.69), and P6 (50 μg : 10.33 ± 2.56 ; 500 μg : 7.46 ± 2.60) showed the highest leishmanicidal activity, whereas P3 (50 μg : 22.29 ± 20.37 ; 500 μg : 6.30 ± 2.67) and P4 (50 μg : 27.05 ± 24.21 ; 500 μg : 9.98 ± 0.75) exhibited moderate activity.

Cytotoxicity toward GM cells was also concentration dependent. At 50 $\mu\text{g/mL}$, P1 (74.03 ± 5.50), P4 (90.08 ± 3.02), and P6 (87.08 ± 5.08) showed low toxicity; P2 (50.26 ± 5.60) and P3 (53.08 ± 3.51) exhibited intermediate toxicity; and P5 (36.53 ± 6.52) showed the highest cytotoxicity. At 500 $\mu\text{g/mL}$, all samples markedly reduced cell viability.

The results indicate greater selectivity for P1 and P6, whereas P5, despite its high antiparasitic activity, exhibited greater toxicity. Variability among samples may be related to differences in propolis chemical composition, particularly phenolic compounds and flavonoids associated with antiparasitic activity (Ribeiro et al., 2023).

CONCLUSION

The results indicate that *Apis mellifera* propolis extracts from Anajatuba, Maranhão, exhibit cytotoxic activity against *Leishmania amazonensis*.

promastigotes. Propolis shows promise as a source of antiparasitic agents, possibly due to the presence of bioactive metabolites, highlighting the importance of Maranhão's biodiversity. Further studies are needed to evaluate efficacy, safety, and potential applications.

Apoio: FUNDECI/BNB, FAPEMA, CNPq, CAPES, FINEP, AGERP

REFERÊNCIAS

DUTRA, R.P et al. Brazilian Amazon Red Propolis: Leishmanicidal Activity and Chemical Composition of a New Variety of Red Propolis. *Metabolites*, v. 13, n. 9, p. 1027, 2023. <https://doi.org/10.3390/metabo13091027>

PRADHAN, S. et al. Treatment options for leishmaniasis. *Clinical and experimental dermatology*, v. 47, n. 3, p. 516-521, 2022.

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

RIBEIRO, V.P, et al. A RP-HPLC–DAD method for analysis of Brazilian southeast brown propolis and its leishmanicidal properties. *Biomedical Chromatography*, 2023, 37.8: e5634.

RUIZ-POSTIGO, J.A. et al. Global leishmaniasis surveillance: 2019–2020, a baseline for the 2030 roadmap. *Weekly Epidemiological Record*, v. 96, n. 35, p. 401–419, 2021.

NETO, J. G. O. et al. Structural, thermal, electronic, vibrational, magnetic, and cytotoxic properties of chloro (glycinato-N, O)(1, 10-phenanthroline-N, N')-copper (II) trihydrate coordination complex. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 226, p. 111658, 2022.

Palavras-chave: leishmaniose; própolis; leishmania amazonensis; produtos naturais; atividade antiparasitária/leishmaniasis; propolis; leishmania amazonensis; natural products; antiparasitic activity.

