



Fábio Tonissi Moroni

**PESQUISA DO EFEITO TRIPANOMICIDA DA PRÓPOLIS:  
estudos “in vitro” e “in vivo”.**

*Uberlândia – Minas Gerais*

*Janeiro de 2001*

**SISBI/UFU**



1000201941

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**PESQUISA DO EFEITO TRIPANOMICIDA DA PRÓPOLIS:  
estudos “in vitro” e “in vivo”.**

Fábio Tonissi Moroni

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Uberlândia, como  
parte das exigências do Curso de Pós-  
graduação em Genética e Bioquímica, para  
obtenção do Título de Mestre em Genética  
e Bioquímica

Uberlândia – Minas Gerais  
Janeiro de 2001

39898

0070-62960

D SISBI/UFU  
201941 ex. 1

Universidade Federal de Uberlândia  
BIBLIOTECA

FU-00012397-1

#### FICHA CATALOGRÁFICA

M868p Moroni, Fábio Tonissi, 1974 –  
Pesquisa da ação tripanomicida da própolis : estudos “in vitro” e “in vivo”/ Fábio Tonissi Moroni. –Uberlândia, 2001.  
58f. : il.  
Orientador : Amélia Hamaguchi.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Curso de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica  
Bibliografia : f.44-57.  
1.Propole – Teses. 2.Tripanossoma cruzi – Teses. 3. Chagas, Doença de – Teses. I. Universidade Federal de Uberlândia. Curso de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. II. Título.

CDU: 615.32(043)

A Ciência é uma das mais extraordinárias criações do homem. No entanto, ela não é lugar de certezas absolutas e, exceto nas matemáticas, na qual sabemos exatamente as condições em que um teorema é verdadeiro, nossos conhecimentos científicos são necessariamente parciais e relativos.

Gilles-Gaston Granger, 1994.



Dedico esta dissertação

Aos meus pais Ulisses Moroni e Célia Tonissi Moroni

À Raquel Borges

## Agradecimentos

A Deus pelo dom da vida.

A minha família pelo apoio indispensável.

À Professora Dr<sup>a</sup> Amélia Hamaguchi, pelo exemplo de dedicação e competência, pelo entusiasmo com que sempre tratou este trabalho e pela confiança depositada em mim, auxiliando no meu crescimento pessoal e científico.

À Professora Dr<sup>a</sup> Maria Inês Homs Brandeburgo pelo estímulo para realização deste trabalho.

Ao Professor Dr. Malcon A.M. Brandeburgo pela iniciação nos caminhos da Ciência.

Ao Professor Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho, que gentilmente cedeu o laboratório para realização de uma das etapas deste trabalho.

A Professora Dr<sup>a</sup> Benvinda R. dos Santos, pela contribuição neste trabalho.

A Professora Dr<sup>a</sup> Ana Maria Bonetti pela colaboração neste trabalho.

Ao Professor Dr. Paulo Gontijo, que gentilmente disponibilizou materiais e recursos humanos do seu laboratório para uma das análises realizadas neste trabalho.

A Regildo Márcio Gonçalves da Silva pelos ensinamentos presenteados.

Ao Vallée Nordeste e Pentapharm pelo fornecimento dos animais utilizados neste experimento.

Ao Apiário Girassol, especialmente a pessoa do Sr Cláudio Franco Lemos da Silva, que gentilmente forneceu própolis bruta durante todo o período deste trabalho.

Aos amigos e colegas de laboratório: Fábio Oliveira, Tatyana, Francislene, Luiz Fernando, Willian, Gilvan, Rodrigo, Ana Flávia, Fabiana, Helen, Renata, Cristiane, Júnia, Carla, Poliana, Polyana, Jean, Luiz Carlos, Alexandra e Neigmar, pela solidariedade e companheirismo.

Aos técnicos do laboratório: Sebatiana Abadia Inácio, Cleuber e Sebastiana Lourdes de Oliveira pelo apoio sempre constante.

Aos novos amigos e aos velhos companheiros.

Aos professores e funcionários do Instituto de Genética e Bioquímica, que direta e indiretamente colaboram para o enriquecimento deste trabalho.

Aos órgãos de fomento CAPES e CNPq, pelas bolsas concedidas e a PROPP/UFU pelo material fornecido.

Para todos aqueles que de alguma forma auxiliaram na realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

Resumo.....	i
1 – Introdução.....	1
1.1 – Considerações gerais.....	1
1.2 - Origem da própolis e utilização do mesmo na colméia de abelhas ( <i>Apis mellifera</i> ).....	1
1.3 - Composição da própolis.....	3
1.4 – Aplicações da própolis.....	3
1.5 – A doença de Chagas.....	6
2 – Objetivo.....	12
2.1 – Objetivo geral.....	12
2.2 – Objetivos específicos.....	12
3 – Material e Métodos.....	13
A – Material.....	13
3.1 – Biológicos.....	13
3.1.1 – Animais.....	13
3.1.2 – <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	13
3.1.3 – Propólis.....	13
3.2 – Agentes químicos.....	13
3.2.1 – Inibidores do óxido nítrico sintase (NOS).....	14
3.2.2 – Reagentes.....	14
B – Métodos.....	14
3.3 – Preparação dos extratos.....	14
3.3.1 – Extrato Aquoso de própolis (EAP).....	14
3.3.2 – Extrato Tweenólico de própolis (ETP).....	14
3.3.3 – Extrato Etanólico de própolis (EEP).....	15
3.4 – Produção da infecção com <i>T. cruzi</i> .....	15
3.5 – Determinação da parasitemia de camundongos infectados com <i>T. cruzi</i> .....	15
3.6 – Teste de microhematócrito para detecção de <i>T. cruzi</i> .....	16
3.7 – Estudos do efeito tripanomicida “in vitro” dos extratos de própolis.....	16
3.8 – Tratamento dos camundongos experimentalmente infectados com <i>T. cruzi</i> .....	17
3.9 – Avaliação da eficiência de dois extratos de própolis (extratos aquosos e tweenólico) sobre a parasitemia e mortalidade em camundongos experimentalmente infectados com <i>T. cruzi</i> .....	17
3.10 – Estudos “in vitro” do extrato aquoso de própolis (EAP) em diferentes concentrações.....	18



3.11 - Estudos “ in vitro” da ação tripanomicida do extrato tweenólico de própolis (ETP) em diferentes concentrações.....	18
3.12 - Estudos “ in vitro” da ação tripanomicida do extrato etanólico de própolis (EEP) em diferentes concentrações.....	18
3.13 – Pesquisa da influência do etanol nos experimentos “in vitro” .....	19
3.14 – Verificação da atividade do extrato aquoso de própolis em pré-incubação por 2h, 1h e 0h antes da infecção com <i>T. cruzi</i> .....	19
3.15 – Avaliação da influência do sistema oxido nítrico no mecanismo de ação do extrato aquoso de própolis (EAP).....	19
3.16 Determinação da curva dose-efeito do extrato aquoso de própolis (EAP) aplicado, por via oral, em diferentes concentrações.....	20
3.17 Determinação da curva dose-efeito do extrato aquoso de própolis (EAP), aplicado por via intraperitoneal, em diferentes concentrações.....	20
3.18 Avaliação do melhor período de tratamento via oral (15, 10, 5 dias) em camundongos experimentalmente infectados com <i>T. cruzi</i> .....	20
3.19 Avaliação do melhor período de tratamento intraperitoneal (5, 10 e 15 dias) em camundongos experimentalmente infectados com <i>T. cruzi</i> .....	21
3.20 Avaliação da eficácia do pré-tratamento, via oral, aos 7, 3 e 1 dia antes da infecção com <i>T. cruzi</i> .....	21
3.21 Avaliação da eficácia do pré-tratamento, via intraperitoneal aos 7, 3 e 1 dia antes da infecção com <i>T. cruzi</i> .....	21
3.22 Análises estatísticas.....	21
4 – Resultados.....	22
4.1 Avaliação da eficiência de dois extratos de própolis (Extratos Aquoso e Tweenólico) sobre a parasitemia e mortalidade em camundongos experimentalmente infectados com <i>T. cruzi</i> .....	22
4.2 Estudos “in vitro” do extrato aquoso de própolis (EAP) em diferentes concentrações.....	23
4.3 Estudo “in vitro” do Extrato Tweenólico de Própolis (ETP) em diferentes concentrações.....	24
4.4 Estudo “ in vitro” do Extrato Etanólico de Própolis (EEP).....	25
4.5 Pesquisa da influência do etanol nos experimentos “ in vitro”.....	26
4.6 Verificação da atividade da própolis em pré-incubação por 2 h, 1h e 0h antes da infecção com <i>T. cruzi</i> “in vitro”.....	27
4.7 Avaliação da influência do sistema óxido nítrico no mecanismo de ação de ação do extrato aquoso de própolis (EAP).....	28
4.8 Determinação da curva dose-efeito do EAP aplicado, por via oral, em diferentes concentrações.....	30
4.9 Determinação da curva dose-efeito do EAP aplicado por via intraperitoneal , em diferentes concentrações.....	31
4.10 Avaliação do melhor período de tratamento via oral (15, 10, 5 dias) em camundongos experimentalmente infectados com <i>T. cruzi</i> .....	33

4.11 Avaliação do melhor período de tratamento intraperitoneal (5, 10 e 15 dias) em camundongos experimentalmente infectados com <i>T. cruzi</i> .....	33
4.12 Avaliação da eficácia do pré- tratamento , via oral, aos 7, 3 e 1 dia antes da infecção.....	34
4.13 Avaliação da eficácia do pré- tratamento, via intraperitoneal, aos 7, 3 e 1 dia antes da infecção.....	35
5 – Discussão.....	36
6 – Conclusão.....	43
7 – Referência Bibliográficas.....	44
8 – Abstract.....	58



## Lista de Figuras

<b>Figura 1</b> – Variação da parasitemia média, no 6º, 7º e 8º dia pós-infecção, em camundongos experimentalmente infectados com <i>T. cruzi</i> e tratados com EAP e ETP, dose de 135 mg/kg, via oral.....	22
<b>Figura 2</b> – Variação média do tempo de sobrevivência de camundongos experimentalmente infectados com <i>T. cruzi</i> e tratados com EAP e ETP, dose de 135 mg/kg.....	23
<b>Figura 3</b> -- Determinação da curva dose- efeito para o Extrato Aquoso de Própolis (EAP), administrado pela via oral.....	30
<b>Figura 4</b> -- Efeito do tratamento com EAP, via oral, sobre o tempo de sobrevivência dos animais experimentalmente infectados com <i>T. cruzi</i> .....	31
<b>Figura 5</b> -- Curva dose-efeito do extrato aquoso de própolis (EAP) , administrado via intraperitoneal.....	32
<b>Figura 6</b> -- Efeito do tratamento com EAP, via intraperitoneal, sobre o tempo de sobrevivência dos animais experimentalmente infectados com <i>T. cruzi</i> .....	32
<b>Figura 7</b> -- Avaliação do melhor período de tratamento, via oral (5, 10 e 15 dias).....	33
<b>Figura 8</b> -- Avaliação do melhor período de tratamento, via intraperitoneal (5, 10 e 15 dias).....	33
<b>Figura 9:</b> Efeito do pré-tratamento sobre a parasitemia dos animais, via oral, com EAP aos 7, 3 e 1 dia antes da infecção experimental com <i>T. cruzi</i> .....	34
<b>Figura 10:</b> Efeito do pré-tratamento sobre a mortalidade dos animais, via oral, com EAP aos 7, 3 e 1 dia antes da infecção experimental com <i>T. cruzi</i> .....	34
<b>Figura 11:</b> Efeito do pré-tratamento sobre a parasitemia dos animais, via intraperitoneal, com EAP aos 7, 3 e 1 dia antes da infecção experimental com <i>T. cruzi</i> .....	35
<b>Figura 12</b> : Efeito do pré-tratamento sobre a mortalidade dos animais, via intraperitoneal, com EAP aos 7, 3 e 1 dia antes da infecção experimental com <i>T. cruzi</i> .....	35

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1-</b> Algumas das principais aplicações da própolis.....	5
<b>Tabela 2-</b> Perspectivas de novos quimioterápicos específicos.....	10
<b>Tabela 3.</b> Resultados do tratamento “in vitro” com diversas concentrações de EAP.....	24
<b>Tabela 4.</b> Resultado do tratamento “in vitro” com diversas concentrações de ETP.....	25
<b>Tabela 5-</b> Resultado do tratamento “in vitro” com diversas concentrações de EEP.....	26
<b>Tabela 6-</b> Tratamento do <i>Trypanosoma cruzi</i> com etanol nas concentrações de 10, 20 e 40% (v/v), “in vitro”.....	27
<b>Tabela 7-</b> Pré-incubação por 2 h, 1h e 0h antes da infecção com <i>T.cruzi</i> “in vitro”.....	28
<b>Tabela 8-</b> Avaliação do mecanismo de ação do Extrato Aquoso de Própolis (EAP), com ou sem consorciação a inibidores da NO sintase.....	29



## **PESQUISA DO EFEITO TRIPANOMICIDA DA PRÓPOLIS:**

### **estudos "in vitro" e "in vivo".**

A doença de Chagas é uma das mais importantes doenças parasitárias da América Latina, em virtude de sua alta incidência, prevalência e repercussão sócioeconômica que esta endemia causa aos países. Apesar dos esforços, um número muito reduzido de drogas tem sido indicados para o tratamento específico da doença, todas com efeitos colaterais, eficácia sobre algumas cepas e ação restrita à fase aguda da doença. Estudos realizados "in vitro" demonstraram que preparações com a própolis, obtida em colméias de abelhas, possuem alta atividade contra o *T. cruzi*, inibindo a proliferação dentro da célula hospedeira. O presente trabalho consiste em caracterizar o melhor solvente, período de tratamento e pré-tratamento, dose de extrato para redução da parasitemia e o tempo de sobrevivência "in vivo" em camundongos Swiss infectados com  $5 \times 10^4$  formas infectantes da cepa Y do *T. cruzi*. Própolis bruta de *Apis mellifera* (100 g), coletada na região de Patrocínio - MG, foi imersa em 500 ml de água desionizada, triturada e aquecida a 80°C durante 120 minutos, filtrada, liofilizada e ressuspendida em concentrações desejadas, obtendo-se o extrato aquoso de própolis (EAP). O extrato tweenólico de própolis (ETP) foi obtido pela imersão de própolis de *Apis mellifera* em 500 ml de Tween 80 (5%) em água deionizada e seguindo a mesma forma de preparo que o EAP. O extrato etanólico de própolis (EEP) foi obtido através da dissolução de 100 g da própolis bruta em 500 ml de etanol a 80% (v/v), aquecida a 80°C por 120 minutos, triturada, filtrada e evaporada em chapa quente a 75°C. O resíduo seco foi ressuspendido em etanol 80% (v/v) em concentrações desejadas. O EAP demonstrou ser melhor que ETP tanto nos ensaios "in vitro" como "in vivo". O EEP apresentou interferência nos ensaios "in vitro" devido à influência do etanol. O EAP foi administrado em doses crescentes, via intraperitoneal, até 1849,6 mg/kg e via oral, até 1230,7 mg/kg, em camundongos infectados com *T. cruzi*, os quais apresentaram redução da parasitemia e aumento do tempo de sobrevivência. As melhores doses via oral e intraperitoneal foram, respectivamente, de 153,8 mg/kg e 924,8 mg/kg, com porcentagem de redução da parasitemia em 81,9% e 68,6%. O tratamento prévio dos animais com EAP, na dose de 153,8 mg/kg (via oral) e 924,8 mg/kg (via intraperitoneal), mostrou-se eficiente quando realizado 24 horas (via oral) e 72 horas (via i.p.) antes da infecção com *T. cruzi*. O período de tratamento, "in vivo", mais eficaz foi de 5 dias para as duas vias de administração. Para investigar o possível envolvimento do sistema óxido nítrico no mecanismo de ação do EAP, inibidores da NOSi (L-NAME e NOARG) foram testados "in vitro", demonstrando que o EAP possui ação tripanomicida mesmo na presença dos inibidores, indicando um mecanismo independente de NO. Os resultados obtidos nesse trabalho sugerem que o extrato aquoso de própolis possui componente(s) capaz(es) de atuar sobre a parasitemia de camundongos infectados com *T. cruzi*, reduzindo significativamente, o número de parasitas durante a infecção, por um mecanismo de ação dependente da dose. (Apoio financeiro: CAPES, PROPP/UFU e CNPq)



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Considerações gerais

O interesse do homem pela própolis, um produto resinoso coletado pelas abelhas em determinadas plantas, é de longa data. No antigo Egito, os corpos dos faraós eram embalsamados com uma mistura de própolis e ervas aromáticas (Kosonocka, 1991). Na Grécia antiga, a própolis também era conhecida, como demonstra a origem grega do nome, que significa **pro**: diante e **polis**: cidade; diante da cidade, por ser encontrada na entrada da colmeia.

Foi considerado por Aristóteles como “um remédio para os males da pele, as chagas e as supurações”; mencionada por médicos romanos e gregos; conhecida pelos Incas, que a utilizavam em quadros de infecções febris (Guerra & Utibe, 1988).

## 1.2 Origem da própolis e utilização do mesmo na colméia de abelhas (*Apis mellifera*)

Própolis designa toda uma série de substâncias resinosas, gomosas e balsâmicas, de consistência viscosa, cuja cor varia de amarelo-esverdeada a castanho-escura ou avermelhada, de acordo com a fonte onde foi coletada. Obtida em partes de determinadas plantas (principalmente de cascas) pelas abelhas, que a transportam à colméia e a modificam em parte, provavelmente, pela adição de certas secreções como a cera e secreções salivares (Donadieu, 1986). Foi observado por Helfenberg apud Guisalberti (1979) que as abelhas obtinham própolis de ramos, brotos e folhas de bétula, freixo, elmo, bálsamo e, por isso, a composição química e o valor antibiótico variavam. Segundo Greenaway et al. (1990) a própolis tem uma origem externa, a partir da gema de árvores e outra, interna, resultante da regurgitação de substâncias resinosas.

A origem vegetal da própolis foi confirmada por Vansell & Bisson apud Ghisalberti (1979). Esses últimos concluíram que a própolis norte-americana, dos estados do oeste era originada dos botões florais de *Populus nigra* e *Alnus viridis*.

Em alguns municípios de Minas Gerais onde predomina vegetação típica de cerrado, a origem botânica foi determinada por Bastos (2000), por meio de identificação do pólen contido na própolis bruta durante o período de abril/95 a julho/98, cuja principal fonte do material resinoso consiste das gemas foliares de *Baccharis dracunculifolia*, popularmente conhecida como “carqueja”, com alguma contribuição de *Vernonia polyanthes* (“assa-peixe”).

A própolis se constitui num material de construção, reparo, isolamento e proteção, utilizada pelas abelhas em suas colméias para reduzir ou vedar buracos e fendas; reparar e reforçar a borda dos favos; diminuir a área do alvado (entrada da colméia), revestimento da parede interna da colméia e para cobrir carcaças de invasores da colméia, que as abelhas não conseguem retirar, mumificando-os (Mobus, 1972). Chauvin (1992) relata a hipótese de que a ausência da própolis ao redor dos favos é o sinal determinante para as abelhas reconstruírem a colméia.

A coleta de própolis é efetuada por um número relativamente restrito e especializado de abelhas operárias campeiras (abelhas mais velhas).

A coleta se efetua, resumidamente, assim:

- a) a operária faz uso de suas antenas para encontrar a parte mais interessante da fonte de própolis;
- b) com as mandíbulas e pernas posteriores, quebra pedaços de exsudados ou rompe as gemas foliares da planta e alcança os tricomas cheios de material resinoso, que são umedecidos com a glossa (língua) e transformados em bolotas pelas mandíbulas;
- c) com a ajuda de outros pares de patas e mandíbulas, a operária leva a bolota de própolis até a “corbícula” (espécie de cesto, na pata posterior, para transportar pólen ou própolis). Enquanto o pedaço de própolis está sendo colocado na corbícula, a abelha já está procurando por mais própolis. Os movimentos complexos das pernas das operárias, envolvidos neste comportamento, foram identificados por Meyer (1956) e Bastos (2000).

A coleta da própolis é demorada e as abelhas operárias coletoras só retornam à colméia com a corbícula cheia. Quando entram na colméia carregadas de própolis ficam aguardando a ajuda de outras para a remoção da mesma, a qual é imediatamente utilizada.



### 1.3 Composição da própolis

A composição da própolis é variável segundo a fonte vegetal utilizada pelas abelhas (Diaz, 1974).

Cada espécie da família Apidae apresenta em sua colmeia, própolis com composição diferente das demais. Abelhas indígenas brasileiras (Meliponídeos) apresentam em sua composição alto conteúdo de terra, que por isso, é denominada geoprópolis (Kerr, 1987; Bankova et al., 1998a).

Outro fator que influi na composição da própolis é a sazonalidade climática da região onde se localiza a colmeia. (Koo & Park, 1997; Waldschmidt et al., 1997; Bankova et al., 1998b).

Genericamente, sabe-se que essa composição consiste de uma complexa mistura composta por 30% de ceras, 55% resinas e bálsamos, 10% óleos essenciais, 5% de pólen mais álcool cinâmico e flavanóides (Guisalberti et al., 1978; Vanhalen e Vanhallen-Frasté, 1979; Bankova et al, 1987; Bezzan, 2000).

Foram identificadas as estruturas químicas de muitos componentes da própolis bruta de *Apis mellifera*, sendo os principais compostos químicos: flavonas; flavanóides; cumarinas; aldeídos aromáticos; ácidos fenólicos; ácidos orgânicos; minerais; vitaminas; polissacarídeos; ácidos graxos; derivados do álcool e fenóis ; glicerol fosfato; glicerol; chalconas; diidrochalconas; hidrocarbonetos; cetonas; terpenóides; ésteres de ácido aromáticos, esteróides; açúcares e outros compostos (Crane, 1983; Greenaway et al., 1990; Seifert & Haslinger, 1991; Marcucci, 1996).

### 1.4 Aplicações da própolis

Pesquisas realizadas revelaram a atuação da própolis contra algumas doenças parasitárias.

Mirayes et al.(1988) demonstraram que o extrato de própolis, administrado em 138 pacientes ,foi eficaz para o tratamento da giardíase, sem causar nenhum efeito colateral. Torres et al.(1990) também descreveram a ação inibitória da própolis sobre o crescimento da *Giardia lamblia*, “in vitro”.

Higashi & De Castro (1994) estudaram as propriedades antiprotozoárias de diferentes extratos de própolis contra o *Trypanosoma cruzi*. Extratos etanólico de própolis (EEP) e extrato dimetil sulfoxido de própolis (DEP) foram ambos ativos contra as 3 formas do parasita (epimastigota, tripomastigota, amastigota).

A lise total dos tripomastigotos da corrente sanguínea foi observada após 24 horas na presença do EEP na concentração de 100 µg/ml. O efeito foi dependente da temperatura. Tratamento dos macrófagos peritoniais infectados e das células musculares do coração, com EEP, inibiram fortemente os níveis de infecção.

Em outro estudo, De Castro & Higashi (1995) administraram diferentes formulações da própolis, em camundongos experimentalmente infectados com *Trypanosoma cruzi* e monitoraram a parasitemia e as médias de sobrevivência. Administração oral do extrato etanólico de própolis (até 1,2 g própolis/kg/dia) oferecido “ad libitum” na água de ingestão (até 4 g/kg/dia) ou adicionado na ração (até 5 g/kg/dia) não interferiram com a parasitemia e a mortalidade dos animais.

De Moura et al. (1998) utilizaram sessenta coelhos, 30 machos e 30 fêmeas, para avaliar o uso de solução hidroalcoólica de própolis (SHL) e robendina (um coccidiostático comercial) constatando que SHL reduziu, linearmente, a contagem de oocistos de *Eimeria spp* nas fezes de coelhos brancos da Nova Zelândia, quando administrado na água de bebida (0,0; 4,0; 8,0; 12,0 e 16,0 ml de SHL/ litro de água),

Por sua vez Gama (1993) sugeriu que a própolis, quando diluída em água e administrada por via oral, atua como um repelente de mosquitos e, portanto, com uma possível eficiência no controle da malária.

Inúmeras aplicações da própolis têm sido descritas em literatura, apresentadas na tabela 1.

**Tabela 1- Algumas das principais aplicações da própolis.**

<b>ATIVIDADE</b>	<b>REFERÊNCIA</b>
Antioxidante	Okonenko, (1986); Misic, (1991); Hemeida & Abd-Alfattah (1993); Krol et al. (1993); Pascual et al. (1994); Sforcin et al. (1995); Queiroz et al. (1996); Park et al. (1998a).
Antimicrobiana	Hoffmann et al. (1998); Kujumgieva, (1999).
Antibacteriana	Krol et al. (1993); Cheng et al. (1996); Mazzuco et al. (1996); Fernandes Jr, (1997); Menezes, (1997); Park et al. (1997).
Antifungica	Lori, (1990); Buhatel, (1992); Azevedo et al. (1999); Cafarchia et al. (1999).
Imunoestimulante	Dimov et al. (1991, 1992, 1995); Ivanovska et al. (1993, 1995); Arai & Kurimoto (1994); Arai & Tatefuji (1996); Shen-Zhiqiang, (1997);
Antimutagênica	Zimonjic et al. (1989).
Antiviral	Kaleta, (1991); Amoros et al. (1992); Dimitrescu et al. (1992, 1993); Serkedjieva et al. (1992); Hegazi et al. (1993).
Antiinflamatória	Ghisalberti, (1979); Marcucci, (1995); Miyataka et al. (1997, 1998); Menezes et al. (1999); Park et al. (1999).
Anticarcinogênica	Matsuno, (1992); Rao et al. (1995); Siess et al. (1996), Suzuki et al. (1996); Matsuno et al. (1997); Banskota et al. (1998).
Hepatoprotetor	Hollands et al. (1991); Tushevskii et al. (1991); Gonzalez et al. (1994); Basnet et al. (1996); Matsushige et al. (1996).
Gastroprotetor	Giral et al. (1990).



## 1.5 A doença de Chagas

A doença de Chagas possui caráter crônico e resulta da infecção pelo protozoário flagelado: *Trypanosoma cruzi*. A doença, primeiramente descrita em 1909 pelo médico brasileiro Dr. Carlos Chagas, é limitada ao continente americano, particularmente aos países latino-americanos tropicais e subtropicais. Baseado em dados de literatura estima-se que, atualmente, 15 a 20 milhões de pessoas nas áreas urbanas e rurais estejam infectadas com o *Trypanosoma cruzi*, na América Latina, com risco de 30% desenvolverem a fase crônica da doença e suas manifestações clínicas (Cunha-Neto et al., 1994).

O parasita é transmitido por um vetor da ordem hemiptera, família Reduviidae e da sub família Triatominae, conhecido popularmente como “barbeiro”, da qual há mais de 100 espécies no continente americano. Existem vários ciclos vetor-hospedeiro da transmissão do *Trypanosoma cruzi*: doméstica, peridoméstica e silvestre. Outras formas de transmissão são infecção congênita, transfusão de sangue, transplante de órgãos, coito, leite materno, oral e também acidentes laboratoriais (De Lana & Tafuri, 1997).

A doença era, originalmente, uma zoonose associada com as camadas da população que viviam ou vivem em moradias precárias nas regiões com grandes reservas florestais. Atualmente o crescimento é devido ao aumento desordenado da população, nas periferias das grandes cidades latino-americanas, propiciando condições adequadas para o desenvolvimento do triatomíneo (Pereira et al., 1985)

Na transmissão vetorial, as formas infectantes do *Trypanosoma cruzi* (tripomastigota metacíclica) são excretadas das partes baixas do trato intestinal do vetor, quando esse defeca durante a hematofagia exercida no hospedeiro. Quando o homem é picado pelo barbeiro há uma sensação de coceira no local, propiciando a transmissão das fezes infectadas, seja na pele, membranas mucosa ou conjuntiva, onde a forma evolutiva infectante atinge a corrente sanguínea. Após penetrar nas células dos tecidos próximos,

eles são submetidos a uma fase intracelular obrigatória. A interação do parasito com as células do sistema mononuclear fagocitário do hospedeiro vertebrado, dá-se em três fases sucessivas: 1-Adesão celular: quando ambos se reconhecem e o contato membrana-membrana ocorre; 2-Interiorização: quando ocorre a formação de pseudópodes e a consequente formação do vacúolo fagocitário; 3-Fenômenos intracelulares: quando as formas epimastigotas são destruídas dentro do vacúolo fagocitário (após sua fusão com o lisossoma e formação do fagolisossoma) ou os tripomastigotas escapam do vacúolo fagocitário, desenvolvendo-se livremente no citoplasma da célula, onde se transformam em amastigotas (três horas após a interiorização). Cada amastigoto se multiplica por divisão binária simples, a cada 12 horas, num total de nove gerações, totalizando 540 parasitos, que, a seguir, se diferenciam por um mecanismo chamado “alongamento”. A célula hospedeira, repleta de parasitos, se rompe, liberando no interstício os tripanosomas tripomastigotas ou mesmo amastigotos que ainda não se diferenciaram, além de detritos celulares da célula hospedeira (Araújo-Jorge, 1989).

No interior da célula hospedeira (macrófagos) o *T. cruzi* irá promover a liberação de uma série de citocinas (termo genérico para moléculas solúveis que promovem interação celular), como IL-12, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , que estimulam as células NK (*natural killers*) a sintetizarem IFN- $\gamma$ . Essas moléculas são responsáveis pela ativação das funções exercidas pelos macrófagos durante os estágios iniciais da infecção, havendo assim a síntese de óxido nítrico (Gazzinelli, 1998). A resistência à infecção por *T. cruzi* tem sido associada com a capacidade dos macrófagos serem ativados pelo INF- $\gamma$  e na produção de TNF- $\alpha$  e de NO, resultando na inibição da replicação e lise dos parasitas presentes em seu interior (Silva, 1999).

O óxido nítrico é um composto produzido pela conversão da L-arginina em L-citrulina pela NO sintase induzida (NOSi) no ciclo denominado citrulina/NO ou ciclo arginina/citrulina que ocorre nos macrófagos (Wu & Morris, 1998). Essas células ativadas, também, produzem outros radicais livres como : ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) e peróxido de hidrogênio. O NO reage com O<sub>2</sub> produzindo peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) o qual é, espontaneamente, transformado em íon hidroxílico (OH<sup>-</sup>) e dióxido de nitrogênio. Esses radicais livres são altamente tóxicos e constituem parte essencial do mecanismo de defesa dos fagócitos para destruir os microorganismos invasores (Hölscher et al., 1998).



Dois estágios da doença podem ser distinguidos em fase aguda e fase crônica. A primeira é caracterizada por altos níveis de parasitemia e parasitismo no tecido. Clinicamente ocorre: febre, adenomegalia, hepatomegalia e esplenomegalia. Eventualmente, sinais da “porta de entrada” podem ser achados como um chagoma de inoculação ou “sinal de Romanã” (edema indolor unilateral da pálpebra). Outras manifestações clínicas na fase aguda incluem edema facial, edema dos membros inferiores, miocardite e meningoencefalite, a última podendo ser fatal para crianças novas. A parasitemia pode ser demonstrada pela observação direta do parasita no sangue fresco preparado ou esfregaço sanguíneo e pelo xenodiagnóstico. A fase aguda freqüentemente desaparece completamente após quatro a oito semanas nos seres humanos. Cerca de 10% dos casos não possuem sintomatologia clínica. Muitas das manifestações clínicas, especialmente nos neonatos, permanecem sem reconhecimento.

A fase crônica segue a infecção inicial, com algumas lesões irreversíveis, após 10 a 20 anos. As formas mais comuns da fase crônica são: assintomática (latente) cardíaca, digestiva e forma mista. Na forma indeterminada ou latente, não há sintomas ou sinais da doença, não há mudanças no eletrocardiograma ou anormalidades digestivas, mas sorologicamente é positivo. Esta é a forma crônica mais comum da doença. A forma cardíaca é observada, principalmente, em grupos cuja a idade varia de 20 a 40 anos e é caracterizada pelo eletrocardiograma (ECG) com o aparecimento de bloqueio dos feixes atrioventricular associado com mudanças da onda T e da extrasístole ventricular. Falência cardíaca e morte súbita, também, são características. A forma digestiva é caracterizada pela motilidade enfraquecida e megaesôfago. A forma mista consiste da combinação das formas cardíacas e digestivas ou qualquer outra. Outras formas incluem a forma nervosa com lesões neuromotoras do sistema nervoso periférico (Pereira et al., 1985).

O tratamento da doença de Chagas pode ser subdividido em duas categorias: sintomático, quando se busca reverter ou minimizar as manifestações clínicas da doença, ou etiológico, quando o foco situa-se em promover a morte do parasita, buscando a cura parasitológica.

Para as complicações da fase crônica, como perturbações do ritmo cardíaco, insuficiência circulatória e comprometimento do sistema digestivo, a medicação é sintomática, como em outras cardiopatias e distúrbios gastrointestinais (Rey, 1991).

Nas primeiras duas décadas do século passado, as primeiras drogas sintetizadas foram os arsenicais e antimoniais que eram prescritas para o tratamento da infecção por tripanosomatídeos, aos quais o *Trypanosoma cruzi*, geralmente, mostrava-se resistente. Uma mudança significativa no tratamento etiológico, a partir da década de sessenta ocorreu quando foram descritos o Nifurtimox e Benzonidazole, drogas nitro-heterocíclicas que revolucionaram a terapia específica para a infecção provocada pelo *T.cruzi* ( Croft, 1999; Hawking apud De Castro et al., 2000).

O Nifurtimox (3-metil-4-tetrahydro-(5'-nitrofurfurilidenoamino) tetrahydro-4H-1,4-tiazina-1,1-dióxido) foi introduzido na clínica em 1965 e teve sua produção descontinuada no Brasil em 1990, devido à ação seletiva sobre algumas cepas que apenas localizavam-se no extremo sul do país e na Argentina. ( Filardi & Brenner apud De Castro et al., 2000). O Nifurtimox atua via redução do grupo nitro a radicais nitroanions, extremamente reativos, os quais continuam a reagir e produzem metabólitos de oxigênio reduzidos, muito tóxicos. *T. cruzi* tem demonstrado ser, particularmente, deficiente nos mecanismos de detoxicação para os metabólitos de oxigênio, especialmente o peróxido de nitrogênio e por isso mais susceptível à oxidação do que as outras células dos vertebrados (Do Campo, 1997).

O Benzonidazol (N-benzil-2-nitro-1-imidazol acetamida) foi introduzido uma década após o Nifurtimox e é a droga de escolha para o tratamento dos pacientes na fase aguda, indivíduos com a forma crônica indeterminada, com manifestações clínicas pouco expressivas, com o xenodiagnóstico positivo, chagásicos crônicos assintomáticos com parasitemia comprovada e em regime de carências imunitárias (como por exemplo, no uso de imunossuppressores ou pacientes HIV positivos). A ação do Benzonidazol sobre o *T.cruzi* pode envolver um efeito direto sobre a síntese de macromoléculas por ligação covalente ou outras interações dos intermediários de nitroredução com componentes celulares ou ação inibitória sobre a atividade ligante da DNA topoisomerase do parasita (De Castro et al., 2000).

As duas drogas acima citadas permitem efeitos superativos, mas não curativos, isto é, podem diminuir ou mesmo suprimir a parasitemia no curso do tratamento e reduzi-la apreciavelmente, no pós-tratamento, a ponto de negativar o xenodiagnóstico, mas isto não garante e não significa cura. Os efeitos colaterais causados por essas drogas são severos e podem levar os pacientes a abandonarem o tratamento (Silva, 1994).



Manifestações tóxicas relacionadas ao sistema digestivo como náuseas, vômitos, epigastralgia são mais comuns com o Nifurtimox, enquanto reações cutâneas e perda de peso, são mais frequentes com o Benzonidazol. Os principais efeitos colaterais atribuídos às duas drogas são alterações hematológicas (leucopenia, púrpura, agranulocitose, diminuição da medula óssea, febre); dermatológicas (reações de hipersensibilidade em 30% dos pacientes tratados) e neurológicas (polineuropatia). Nenhuma das duas drogas pode ser administrada para gestantes e portadores de doenças severas associadas à Doença de Chagas (Luquetti, 1997).

Assim, devido aos efeitos tóxicos acima citados, a ação diferenciada em relação ao tipo de cepa e a eficácia controversa na fase crônica, o tratamento específico da Doença de Chagas necessita de mudanças (De Castro, 1993; Filardi & Brenner apud De Castro, 2000).

Algumas das principais perspectivas de novos medicamentos descritas na literatura estão resumidas na tabela abaixo:

**Tabela 2- Perspectivas de novos quimioterápicos específicos**

Medicamento	Mecanismo de ação	Bibliografia
Alopurinol	Competição com adenosina e bloqueio da síntese de novo de nucleotídeos purínicos	Hammond & Gutteridge (1984); Marr, (1991); Apt et al., (1998).
Inibidores da ciclooxigenase	Bloqueio dos fatores que induzem a replicação e dispersão do parasita	Freire-de-Lima et al., (2000).
Inibidores da biosíntese do ergosterol sobre o <i>T. cruzi</i>	Depleção dos esteróis endógenos essenciais e/ou acúmulo de reativos intermediários tóxicos	Sheehan et al apud De Castro et al., (2000); Urbina et al.(1996).

Há, também, a busca de validação de alvos no metabolismo celular do parasita que podem dar início ao desenvolvimento de novas drogas como estudos sobre o metabolismo do inositol (Oliveira et al., 2000a), de organelas que acumulam cálcio e cisteína protease, respectivamente, denominadas de calcisomo ácido e reservosomo (De Souza et al., 2000), inibidores da tripanotona redutase, um homólogo da glutiona

reduzase do parasita, envolvida no processo de regulação do estresse oxidativo do parasita (Horvath, 1997).

Os estudos terapêuticos da doença de Chagas têm sido realizados pela utilização de modelos experimentais, como ratos e camundongos. Dentre estes, os camundongos destacam-se por apresentarem maior nitidez no desenvolvimento das fases características da doença. Na fase aguda, sua parasitemia descreve uma curva típica semelhante ao humano (Sherlock, 1984) e, na fase crônica, as lesões cardiovasculares são intensas e também semelhantes às que ocorrem no homem quando desenvolve a cardiopatia grave (Schlemper Jr. et al., 1983).

No contexto dos esforços correntes para o desenvolvimento da quimioterapia da doença de Chagas, produtos naturais, com potencial de atividade anti *T. cruzi* precisam ser pesquisados mais freqüentemente, com o objetivo de desenvolver novas drogas com alta atividade e baixa toxicidade (De Castro et al., 1987).

Estudos feitos por Higashi & De Castro (1994) mostraram que as preparações com a própolis tem alta atividade contra o *T. cruzi*, inibindo a proliferação dentro da célula hospedeira.

O Laboratório de Química de Proteínas e Produtos Naturais do INGEB/UFU, tem estudado algumas espécies vegetais que possuem efeitos anti- *T. cruzi* tais como a *Madevilla velutina* (Silva, 1996), *Gingko biloba* (Silva et al., 2000), *Moringa oleifera* (Oliveira et al., 2000b).

A quimioterapia específica da doença de Chagas é uma área de pesquisa muito intensa (revisto em De Castro, 1993; Croft et al., 1997; Urbina, 1999). As indústrias farmacêuticas têm pouco interesse no desenvolvimento de quimioterápicos contra essa doença, por serem esses programas muito caros, especulativos e longos, não sendo assim justificados em uma base puramente comercial (Gutteridge, 1987). Cabe às instituições de pesquisa, as Universidades e aos governos, principalmente, dos países contidos em áreas endêmicas, subsidiar esse tipo de investigação.

## 2. OBJETIVO

### 2.1 Objetivo Geral

Estudar os efeitos da própolis na fase aguda da doença de Chagas experimentalmente induzida em camundongos infectados com a cepa “Y” do *Trypanosoma cruzi*, por meio da análise da parasitemia e monitoramento do tempo de sobrevivência dos animais.

### 2.2 Objetivos específicos

- Testar os extratos de própolis aquoso, etanólico e tweenólico de própolis, “in vitro” e “in vivo”, utilizando camundongos experimentalmente infectados com *T. cruzi*.
- Definir o melhor período de tratamento em camundongos experimentalmente infectados com *T. cruzi*.
- Definir o melhor período de pré-tratamento em camundongos experimentalmente infectados com *T. cruzi*.
- Pesquisar possíveis mecanismos de ação da própolis.



## 3. MATERIAL E MÉTODOS

### A- MATERIAL

#### 3.1 Biológicos

##### 3.1.1 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss (*Mus musculus*) machos *outbred*, com 4 a 6 semanas, pesando entre 24 a 35 gramas, padrão sanitário convencional, fornecidos pelo Biotério do Vallée e/ou da Pentapharm e mantidos no Laboratório de Química de Proteínas e Produtos Naturais do INGEB/UFU, com água e ração *ad libidum*, à temperatura ambiente.

##### 3.1.2 *Trypanosoma cruzi*

Foi utilizada a cepa “Y” do *T. cruzi*, fornecida pelo laboratório de Parasitologia da Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro (Uberaba-M.G.), originada de camundongos infectados, e mantida por repique semanal nos animais do Laboratório de Química de Proteínas e Produtos Naturais do INGEB/UFU.

##### 3.1.3 Própolis

Foi utilizada própolis bruta de *Apis mellifera*, da região de Patrocínio-MG, gentilmente cedido pelo Sr. Cláudio Franco Lemos da Silva, proprietário do Apiário Girassol, com sede no município de Uberlândia-MG.

## 3.2 Agentes químicos

### 3.2.1 Inibidores da Óxido Nítrico Sintase (NOS)

Foram utilizados dois inibidores inespecíficos para a NOS : N $\omega$  – nitro-L-arginina (NOARG) e L-arginina-metil-ester (L-NAME) da SIGMA *Chemical Company*. Os inibidores foram pesados e dissolvidos em água deionizada em concentrações específicas.

### 3.2.2 Reagentes

- Tween 80 ( Polisorbato 80) (Vetec Química Fina Ltda.)
- Etanol (Vetec Química Fina Ltda.)

## B- Métodos

### 3.3 Preparação dos extratos

#### 3.3.1 Extrato Aquoso de própolis (EAP):

A metodologia de preparo é adaptada de Matsushige et al. (1996). Em um becker adicionam-se 500 ml de água desionizada e 100 gramas de própolis bruta triturada em liquidificador. Aguardar 24 horas. Aquece-se a mistura em banho termostático com água a 80°C, por duas horas. Posteriormente essa solução é turbolizada em liquidificador, filtrada (filtro de gaze), acoplado a funil e kitassato. O filtrado será liofilizado durante 48 horas. Finalmente, ressuspende-se o pó resultante em água desionizada nas concentrações desejadas.

#### 3.3.2 Extrato Tweenólico de própolis (ETP)

Em um becker, adicionam-se 500 ml de água desionizada e 25 g de Tween 80. Agita-se até formar uma solução homogênea. Posteriormente adicionam-se 100 g de própolis bruta triturada. Os próximos passos da metodologia de preparo são idênticos aos do EAP.

### 3.3.3 Extrato etanólico de própolis (EEP)

No becker adicionam-se a própolis bruta triturada (100 g) e o etanol 80% (500 ml). Agita-se à temperatura ambiente durante 30 minutos. A solução é turbolizada em liquidificador. Filtra-se em filtro de gaze, adaptado a funil e kitassato. O filtrado é seco em placa de petri sobre placa termostaticada a 75 °C . Ressuspende-se em etanol 80 % nas concentrações desejadas.

### 3.4 Produção da infecção com *Trypanosoma cruzi*

Utilizando a metodologia de Silva (1996), os camundongos normais foram infectados por injeção intraperitoneal de, aproximadamente, 50.000 formas sangüíneas do *T. cruzi*. O inóculo desejado foi preparado a partir da parasitemia pré- determinada por exame de sangue a fresco, no camundongo infectado. O sangue para o inóculo foi coletado por punção cardíaca com seringa heparinizada e diluído em solução de PBS ( tampão fosfato 0,1M com salina 0,09%, pH 7,2) contendo soro fetal bovino a 10%, num volume final do inóculo de 200 µl.

### 3.5 Determinação da parasitemia de camundongos infectados com *T. cruzi*

A parasitemia foi determinada por meio do exame de sangue a fresco (6<sup>o</sup> ao 10<sup>o</sup> dia após a infecção). O animal infectado foi mantido na caixa, com a cauda exposta. O sangue foi coletado por uma mínima secção na extremidade distal da cauda do camundongo, num volume de 5 µl de sangue, por meio de pipetador automático. Esse material foi aplicado entre lâmina (25,4 x 76,2 mm) e lamínula (22 x 22 mm), para contagem do número de parasitas ao microscopio ótico (STUDAR LAB.ZEISS) , na objetiva de 40x. Os parasitas foram quantificados em número de parasitas distribuídos em 50 campos microscópicos de observação. O número de tripomastigotas observados nos campos foi multiplicado pelo fator de correção de 20.000 para o cálculo da



quantidade de parasitos presentes em 1,0 ml de sangue circulante nos camundongos. Posteriormente, monitorou-se o tempo de sobrevivência até o 40º dia após a infecção dos animais com *Trypanosoma cruzi*.

### 3.6 Teste de microhematócrito para detecção de *T.cruzi*

Capilares para microhematócrito foram preenchidos até 1 cm da sua extremidade, a extremidade oposta foi derretida, selando-a. Os tubos foram centrifugados (centrífuga de microhematócrito) por 4 minutos, aclopados na lâmina e lidos ao microscópio óptico, 40 x, com óleo de imersão sobre o limite de separação do plasma com os elementos figurados, no capilar centrifugado. O diagnóstico positivo é dado quando há a visualização do parasita nessa área (Willians, 1995).

### 3.7 Estudos do efeito tripanomicida “in vitro” dos Extratos de própolis

Os ensaios tripanomicidas “in vitro” basearam-se na metodologia desenvolvida por Cover & Gutteridge (1982). Tubos Eppendorf (1,5 ml) contendo 0,4 ml de sangue heparinizado de animais normais foram separados em lotes de 2 tubos. Cada lote recebeu uma diferente concentração de própolis, num volume total de 0,05 ml. Os controles constaram de lotes apenas com *T.cruzi*. Os tubos são homogeneizados por 1 hora, à temperatura ambiente.

Posteriormente, são adicionados aos lotes 0,05 ml de sangue contendo aproximadamente  $1 \times 10^6$  formas sangüíneas de *T.cruzi*. O lote controle recebeu o mesmo volume de água destilada. Os tubos foram homogeneizados por dez minutos e incubados a 4 °C. Depois de 24 e 48 horas de incubação, amostras destas misturas foram examinadas, entre lâmina e lamínula, ao microscópio óptico (objetiva de 40x). Pesquisaram-se 50 campos por lâmina, onde foram analisadas as alterações nas hemácias e os tripomastigotas avaliados quanto à quantidade e à mobilidade, sendo esta última classificada como +++ (muito alta) quando o parasita movia-se pelos quatro quadrantes imaginários do campo ótico; ++ (alta) quando o parasita movia-se apenas por

um quadrante; + (baixa) quando o parasita apresentava uma certa mobilidade mas que não era suficiente para se locomover no campo ótico e – (ausência de parasita).

Nas amostras em que não haviam parasitas, realizou-se o teste do microhematócrito. Caso esse, também, fosse negativo, promovia-se a inoculação do sangue analisado em animais normais, para posterior determinação da parasitemia..

### **3.8 Tratamento dos camundongos experimentalmente infectados com *T.cruzi***

Os animais tratados receberam 0,2 ml dos extratos, por via intraperitoneal ou por via oral (por meio de gavagem, utilizando sonda orogástrica), durante cinco dias com intervalo de 24 horas entre cada tratamento.

Após seis dias da data de inoculação os animais foram monitorados para determinação da parasitemia , até o décimo dia após a infecção (conforme procedimento descrito no item 3.5) . Posteriormente, acompanhou-se o desenvolvimento dos animais até o 40º dia após infecção.

### **3.9 Avaliação da eficiência de dois extratos de própolis (Extratos Aquoso e Tweenólico) sobre a parasitemia e mortalidade em camundongos experimentalmente infectados com *T cruzi***

vinte camundongos foram separados em 4 grupos (n = 5) sendo GA: grupo tratado com extrato tweenólico de própolis (ETP); GB: grupo tratado com extrato aquoso de própolis (EAP); GC: grupo que recebeu apenas H<sub>2</sub>O desionizada; GD grupo que recebeu solução de Tween 80 (5%) em H<sub>2</sub>O desionizada.

Os animais foram tratados durante 5 dias, com intervalo de 24 horas entre os tratamentos, com dose de 135 mg de extrato/kg para cada camundongo, via oral. Posteriormente, foram monitorados conforme item 3.5.



### **3.10 Estudos do efeito tripanomicida “in vitro” do Extrato Aquoso de Própolis (EAP) em diferentes concentrações**

Cada um dos 12 tubos eppendorf foi preenchido com 0,4 ml de sangue de animais normais (4,8 ml no total). Posteriormente, adicionou-se em 10 tubos 0,05 ml de extrato aquoso de própolis nas concentrações de 0,1; 0,2; 0,4; 0,8 e 1,0 g/ml, em duplicata sendo GA: 0,1 g/ml; GB: 0,2 g/ml; GC: 0,4 g/ml; GD: 0,8 g/ml; GE: 1,0 g/ml e GF: controle (recebendo o mesmo volume de água). Após 1 hora, a mistura foi inoculada com 0,05 ml de sangue de animal contaminado com  $5,46 \times 10^6$  tripomastigotas/ml de sangue. 24 e 48 horas após a infecção, 5  $\mu$ l de cada tubo foi analisado entre lâmina e lamínula. Os tubos zerados após 48 horas foram submetidos ao teste do microhematócrito, descrito no item 3.6. Os tubos com resultado negativo, nesse teste tiveram seu conteúdo reinoculado em dois animais normais.

### **3.11 Estudo “in vitro” da ação tripanomicida do Extrato Tweenólico de Própolis (ETP) em diferentes concentrações**

oito tubos eppendorf foram preenchidos com 4,8 ml de sangue de animais normais (0,4 ml em cada). Posteriormente adicionou-se 0,05 ml de ETP, nas concentrações de 0,2; 0,4; 0,8 g/ml, em duplicata, sendo GA: 0,2 g/ml; GB: 0,4 g/ml; GC: 0,8 g/ml e GD: controle. Após 1 hora de incubação, os tubos foram infectados com 0,05 ml de sangue contaminado com  $3,8 \times 10^6$  parasitas/ml. Os próximos passos da metodologia seguem os mesmos procedimentos descritos no item 3.7.

### **3.12 Estudo da “in vitro” da ação tripanomicida do Extrato Etanólico de Própolis (EEP)**

Extrato etanólico de própolis (EEP) nas concentrações de 0,2; 0,4; 0,8 g/ml foi acondicionado em 8 tubos, em duplicata, sendo GA: 0,2; GB: 0,4; GC: 0,8 ml; GD: controle sem tratamento, recebendo apenas o solvente utilizado. O sangue foi infectado com 0,05 ml de sangue contaminado com  $3,18 \times 10^6$  parasitas/ml. Os próximos passos da metodologia seguem os mesmos procedimentos descritos no item 3.7.



### **3.13 Pesquisa da influência do etanol nos experimentos “in vitro”**

Etanol nas concentrações de 10%, 20% e 40% foi utilizado no experimento “in vitro”, seguindo a mesma metodologia do item 3.7. O sangue contido nos tubos foi infectado com 0,05 ml de sangue com  $1,59 \times 10^5$  parasitas/ml.

### **3.14 Verificação da atividade do extrato aquoso de própolis em pré-incubação por 2 h, 1 h e 0 h antes da infecção com *T. cruzi***

8 tubos eppendorf foram agrupados em 4 grupos ( $n = 2$ ), sendo GA: pré-tratado 2 h antes da infecção; GB: pré tratado 1 hora antes da infecção e GC: tratado no momento da infecção. Os procedimentos são os mesmos acima descritos. Todos os tubos receberam Extrato Aquoso de própolis na concentração de 1,0 g/ml. Os procedimentos metodológicos são idênticos ao experimento do item 3.7. Os tubos foram infectados com 0,05 ml de sangue com  $1,15 \times 10^5$  parasitas/ml.

### **3.15 Avaliação da influência do sistema óxido nítrico no mecanismo de ação do Extrato Aquoso de Própolis (EAP)**

0,05 ml de Extrato Aquoso de Própolis (EAP), na concentração de 1,0 g/ml, juntamente com 0,4 ml de sangue de animais normais, foram acondicionados em 12 tubos eppendorf

Foram utilizados dois inibidores da NOS, a N $\omega$ -nitro-2-arginine (NOARG) e L-arginine metil ester (L-NAME). Os tubos foram divididos em 6 grupos sendo: GA: tratado apenas com EAP; GB: tratado com 0,5 mg de inibidor 1 (NOARG); GC: tratado com 0,5 mg de inibidor 2 (L-NAME); GD: tratado com associação de EAP + NOARG; GE: tratado com associação de EAP + L-NAME; GF: não recebeu tratamento algum (controle). 0,05 ml de sangue contaminado com  $1,016 \times 10^6$  parasitas/ml foi introduzido no tubo, após 1 h de incubação. Os procedimentos metodológicos são idênticos ao item 3.7.

### **3.16 Determinação da curva dose-efeito do extrato aquoso de própolis (EAP) aplicado, por via oral, em diferentes concentrações**

Trinta e cinco camundongos infectados com *T.cruzi* foram distribuídos em 7 grupos sendo GA: tratado com dose de 38,5 mg/kg; GB: tratado com 76,9 mg/kg; GC: tratado com 153,8 mg/kg; GD: 307,7 mg/kg; GE: 615,4 mg/kg; GF: 1230,7 mg/kg e GH: controle. Foram tratados via oral conforme item 3.8.

### **3.17 Determinação da curva dose-efeito do extrato aquoso de própolis (EAP), aplicado por via intraperitoneal, em diferentes concentrações**

Quarenta camundongos infectados foram distribuídos em 8 grupos (n=5) sendo: GA: tratado com a dose de 28,9 mg/kg; GB: tratado com 57,85 mg/kg; GC: tratado com 115,6 mg/kg; GD: tratado com 231,2 mg/kg; GE: tratado com 462,4 mg/kg; GF: 924,8 mg/kg; GG: tratado com 1849,6 mg/kg; GH: controle. Os animais foram tratados via intraperitoneal, conforme item 3.8.

### **3.18 Avaliação do período de tratamento com extrato aquoso de própolis, via oral (15, 10, 5 dias) em camundongos experimentalmente infectados com *T. cruzi***

24 camundongos infectados foram tratados durante 5, 10 e 15 dias, sendo GA: tratado durante 15 dias; GB: tratado durante 10 dias, GC: tratado durante 5 dias, todos os animais receberam extrato aquoso de própolis na dose de 153,8 mg/kg, via oral. No período entre o 6º e 8º dia, pós-infecção, a parasitemia foi monitorada e a mortalidade acompanhada até o 40º dia.

### **3.19 Avaliação do período de tratamento com extrato aquoso de própolis, intraperitoneal (5, 10 e 15 dias) em camundongos experimentalmente infectados com *T. cruzi***

vinte e quatro camundongos infectados foram tratados durante 5, 10 e 15 dias, sendo GA: tratado durante 15 dias; GB: tratado durante 10 dias; GC: tratado durante 5 dias. Todos os animais receberam a dose de 924,8 mg/kg, via intraperitoneal. No período



entre o 6º e 8º dia pós-infecção, a parasitemia foi monitorada e a mortalidade acompanhada até o 40º dia.

### **3.20 Avaliação da eficácia do pré-tratamento com extrato aquoso de própolis, via oral, aos 7, 3 e 1 dia antes da infecção com *T.cruzi***

vinte camundongos normais foram divididos em 4 grupos (n=5), sendo: GA: pré-tratado durante 7 dias antes da infecção; GB: pré-tratado durante 3 dias; GC: pré-tratado durante 1 dia e GD: grupo controle. Os animais foram pré-tratados com 0,75 g/kg de EAP, com intervalos regulares de 24 horas, via oral. Foram infectados e após 5 dias da infecção foram monitorados quanto a parasitemia até o 9º dia pós-infecção e quanto a mortalidade até o 40º dia pós-infecção.

### **3.21 Avaliação da eficácia do pré-tratamento com extrato aquoso de própolis, via intraperitoneal aos 7, 3 e 1 dia antes da infecção com *T. cruzi***

vinte camundongos normais foram divididos em 4 grupos, sendo GA: pré-tratados durante 3 dias, GB: pré-tratados durante 3 dias, GC: pré-tratados durante 1 dia e GD: grupo controle. Os animais foram pré-tratados com EAP, via intraperitoneal, na concentração de 4,6 g/kg. Os procedimentos metodológicos são idênticos ao item 3.8.

### **3.22 Análise estatística**

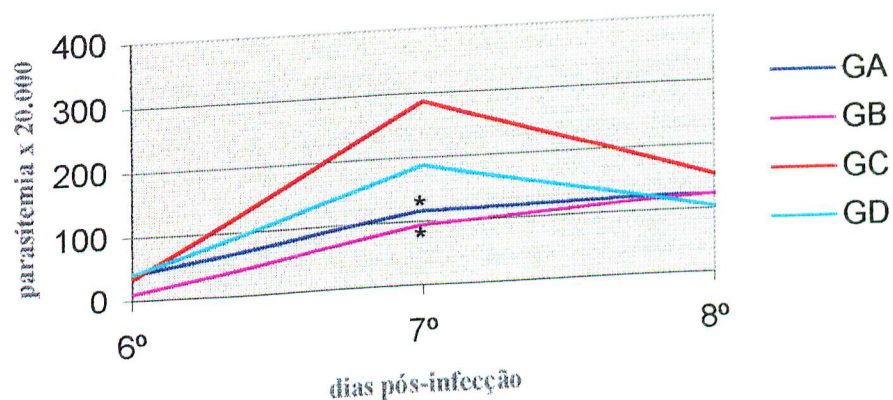
As variáveis obtidas foram submetidas a análise estatística pelo Teste ANOVA e Tukey, utilizando-se o programa Microsoft Systat. Consideraram-se as diferenças entre os grupos como significantes quando  $p < 0,05$ .



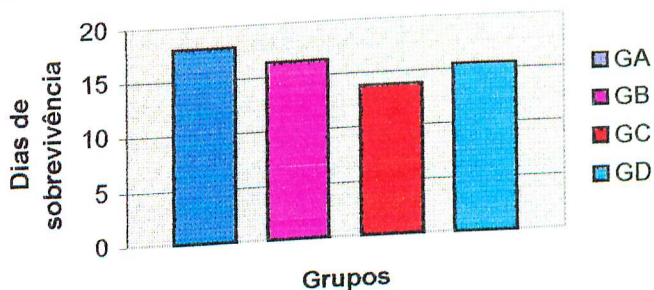
## 4. RESULTADOS

### 4.1 Avaliação da eficiência de dois extratos de própolis (Extratos Aquoso e Tweenólico) sobre a parasitemia e mortalidade em camundongos experimentalmente infectados com *T. cruzi*

Quanto à parasitemia, houve diferença significativa apenas entre os grupos A e B com o C, no 7º dia pós-infecção, com uma redução da parasitemia mais acentuada no grupo B, tratado com EAP (Fig.1). Não houve diferença significativa quanto o tempo de sobrevivência dos animais, conforme mostra a figura 2.



**Figura 1** – Variação da parasitemia média, no 6º, 7º e 8º dia pós-infecção, em camundongos experimentalmente infectados com *T. cruzi* e tratados com EAP e ETP, dose de 135 mg/kg, via oral, sendo GA: tratado com extrato tweenólico de própolis (ETP); GB: tratado com extrato aquoso de própolis (EAP); GC: recebendo apenas H<sub>2</sub>O desionizada; GD recebendo solução de Tween 80 (5%) em H<sub>2</sub>O desionizada. \* = diferença significativa ( $p < 0,05$ ) ANOVA/TUKEY.



**Figura 2** – Variação média do tempo de sobrevivência de camundongos experimentalmente infectados com *T. cruzi* e tratados com EAP e ETP, dose de 135 mg/kg, sendo GA: tratado com extrato tweenólico de própolis (ETP); GB: tratado com extrato aquoso de própolis (EAP); GC: recebendo apenas H<sub>2</sub>O desionizada; GD recebendo solução de Tween 80 (5%) em H<sub>2</sub>O desionizada.

#### 4.2 Estudos do efeito tripanomicida “in vitro” do extrato aquoso de própolis (EAP) em diferentes concentrações

Na tabela 3 estão apresentados os resultados do tratamento “in vitro” com várias concentrações de EAP. Conforme evidenciado na tabela, o EAP apresentou “in vitro” uma relação direta entre atividade tripanomicida e sua concentração.

Nas doses menores (tubos 1 a 6), houve uma redução menos acentuada do que nas doses maiores (tubos 7 a 10), em que ocorreram parasitemia zerados. Esses últimos foram submetidos ao teste do microhematócrito e apresentaram resultado negativo. Posteriormente tiveram seu conteúdo inoculado em animais normais, e, ao prazo de 7 dias, conseguiram produzir infecção os tubos 7 e 8. Os animais inoculados com a mistura dos tubos 9 e 10 não demonstraram parasitemia em níveis detectáveis.

**Tabela 3.** Resultados do tratamento “in vitro” com diversas concentrações de EAP.

Tubos	Concentração EAP	Parasitemia	Mobilidade	Parasitemia	Mobilidade
		x 20.000 24 h	24 h	x 20.000 48 h	48 h
1	0,1 g/ml	03	++	01	++
2	0,1 g/ml	10	++	05	++
3	0,2 g/ml	03	++	04	+
4	0,2 g/ml	06	+	01	+
5	0,4 g/ml	03	+	03	+
6	0,4 g/ml	03	+	03	+
7	0,8 g/ml	02	+	00	-
8	0,8 g/ml	00	-	00	-
9	1,0 g/ml	00	-	00	-
10	1,0 g/ml	00	-	00	-
11	Controle	08	+++	06	+++
12	Controle	06	+++	07	+++

onde: **mobilidade**: +++ = muito alta; ++ = alta; + = baixa; - = ausência de parasita.

#### 4.3 Estudo do efeito tripanomicida “in vitro” do Extrato Tweenólico de Própolis (ETP) em diferentes concentrações

Os tubos 1 e 2, contendo EAP na concentração de 0,2 mg/ml, apresentaram parasitas vivos 24 e 48 horas após a inoculação com *T. cruzi*. Os demais tubos tratados apresentaram parasitas detectáveis apenas 24 horas após a inoculação, tornando-se com a parasitemia zerada após 48 horas (Tab. 4). Posteriormente essas amostras foram submetidas ao teste do microhematócrito, sendo todos positivos.



**Tabela 4.** Resultado do tratamento “in vitro” com diversas concentrações de ETP.

Tubos	Concentração de EAP	Parasitemia x 20.000 24 h	Mobilidade 24 h	Parasitemia x 20.000 48 h	Mobilidade 48 h
1	0,2 g/ml	11	++	1	++
2	0,2 g/ml	06	++	2	++
3	0,4 g/ml	16	++	0	-
4	0,4 g/ml	09	++	0	-
5	0,8 g/ml	02	+	0	-
6	0,8 g/ml	01	+	0	-
7	Controle	22	+++	15	+++
8	Controle	13	+++	13	+++

onde:

**mobilidade:** +++ = muito alta; ++ = alta; + = baixa; - = ausência de parasita

#### 4.4 Estudo do efeito tripanomicida “in vitro” do Extrato Etanólico de Própolis (EEP)

Todas as amostras tratadas com EEP tiveram parasitemia zerada. Os tubos controle também apresentaram ausência de parasitas, 24 horas pós-infecção (Tab. 5), e a contagem dos parasitos após 48 horas de incubação não foi realizada.

**Tabela 5-** Resultado do tratamento “in vitro” com diversas concentrações de EEP

Tubos	Descrição	Parasitemia x	Mobilidade	Parasitemia x	Mobilidade
		20.000	24 horas	20.000	48 horas
		24 horas		48 horas	
1	0,2 g/ml	00	n	n	n
2	0,2 g/ml	00	n	n	n
3	0,4 g/ml	00	n	n	n
4	0,4 g/ml	00	n	n	n
5	0,8 g/ml	00	n	n	n
6	0,8 g/ml	00	n	n	n
7	Controle	00	n	n	n
8	Controle	00	n	n	n

onde:

**teste de mobilidade:** n = não realizado.

#### 4.5 Pesquisa da influência do etanol nos experimentos “in vitro”

O etanol em todas as concentrações testadas influenciou no experimento. Nas concentrações de 10 e 20 % apresentaram resultados positivos nas primeiras 24 horas, porém negativos nas 24 horas seguintes. A solução de etanol 40% foi capaz de impedir totalmente a parasitemia nas primeiras 24 horas, como pode ser observado na tabela 4.

**Tabela 6-** Tratamento do *Trypanosoma cruzi* com etanol nas concentrações de 10, 20 e 40% (v/v), “in vitro”.

Tubos	Concentração de etanol	Parasitemia x 20.000 24 horas	Mobilidade 24 horas	Parasitemia x 20.000 48 horas	Mobilidade 48 horas
1	10%	15	++	00	-
2	10%	08	++	00	-
3	20%	08	++	00	-
4	20%	03	+	00	-
5	40%	01	+	00	-
6	40%	00	-	00	-
7	Controle	22	+++	15	++
8	Controle	13	+++	13	++

onde:

teste de mobilidade: +++ = muito alta; ++ = alta; + = baixa; - = ausência de parasita

#### 4.6 Verificação da atividade da própolis em pré-incubação por 2 h, 1h e 0h antes da infecção com *T.cruzi* “in vitro”

Os tubos pré-tratados com EAP, 2 horas e 1 hora antes da infecção, não apresentaram parasitas visíveis ao M.O. Os tubos tratados, concomitantemente, à infecção, apresentaram parasitas visíveis e com mobilidade detectável, 24 e 48 horas após a infecção (tabela 7). Posteriormente, os tubos com parasitemia zerada foram submetidos ao teste do microhematócrito e todos os tubos foram negativos nesse teste. Na seqüência, o conteúdo de cada um desses tubos foi reinoculado em animais normais e verificou-se parasitemia positiva para todos os animais, ao 7º dia pós-infecção.



**Tabela 7-** Pré-incubação por 2 h, 1h e 0h antes da infecção com *T. cruzi* "in vitro".

Tubos	Descrição(horas de pré-incubação)	Parasitemia x 20.000 24 horas	Mobilidade 24 horas	Parasitemia x 20.000 48 horas	Mobilidade 48 horas
1	2 horas	00	-	00	-
2	2 horas	00	-	00	-
3	1 hora	00	-	00	-
4	1 hora	00	-	00	-
5	0 hora	1	++	1	++
6	0 hora	2	++	1	++
7	Controle	6	+++	3	+++
8	Controle	10	+++	6	+++

onde:

**teste de mobilidade:** +++ = muito alta; ++ = alta; + = baixa; - = ausência de parasita

#### 4.7 Avaliação da influência do sistema óxido nítrico no mecanismo de ação de ação do extrato aquoso de própolis (EAP)

Os tubos do GA (1 e 2) apresentaram parasitemia zerada nas 24 e 48 horas após a infecção. Os tubos do grupo B (3 e 4) apresentaram parasitas com alta mobilidade, o mesmo se repetindo para o grupo C (tubos 5 e 6). O grupo D (7 e 8) apresentou parasitas nas 24 horas porém zerados nas 48 horas. O grupo E (9 e 10) apresentou parasitemia em ambas as análises. O grupo F (11 e 12) apresentou parasitemia e mobilidade muito alta, 24 e 48 horas pós- infecção. Os dados são apresentados na tabela

8.

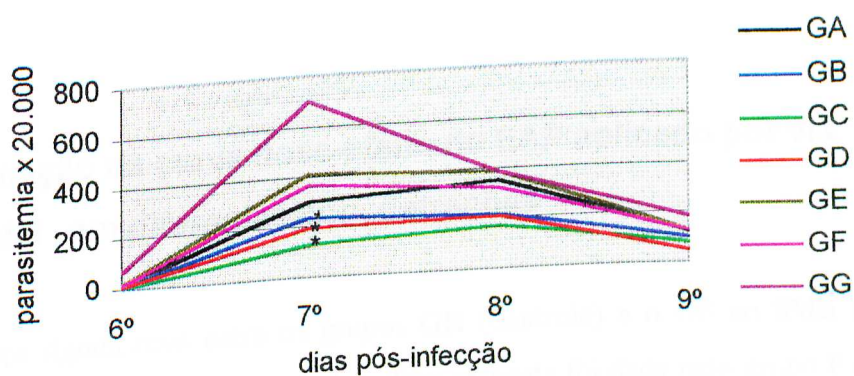
**Tabela 8-** Avaliação do mecanismo de ação do Extrato Aquoso de Própolis (EAP), com ou sem associação a inibidores da NO sintase.

Tubos/ Grupos	Descrição	Parasitemia x 20.000 24 horas	Mobilidade 24 horas	Parasitemia x 20.000 48 horas	Mobilidade 48 horas
1/A	EAP	00	-	00	-
2/A	EAP	00	-	00	-
3/B	NOARG	04	++	09	++
4/B	NOARG	07	++	10	++
5/C	L-NAME	10	++	17	++
6/C	L-NAME	09	++	06	++
7/D	EAP + NOARG	01	+	00	-
8/D	EAP + NOARG	00	-	00	-
9/E	EAP + L-NAME	00	-	00	-
10/E	EAP + L-NAME	00	-	00	-
11/F	Controle	16	+++	18	+++
12/F	Controle	15	+++	19	+++

Onde: NOARG= N $\omega$ -nitro-2-arginine e L-NAME= L-arginine metil ester

#### 4.8 Determinação da curva dose-efeito do EAP aplicado, por via oral, em diferentes concentrações

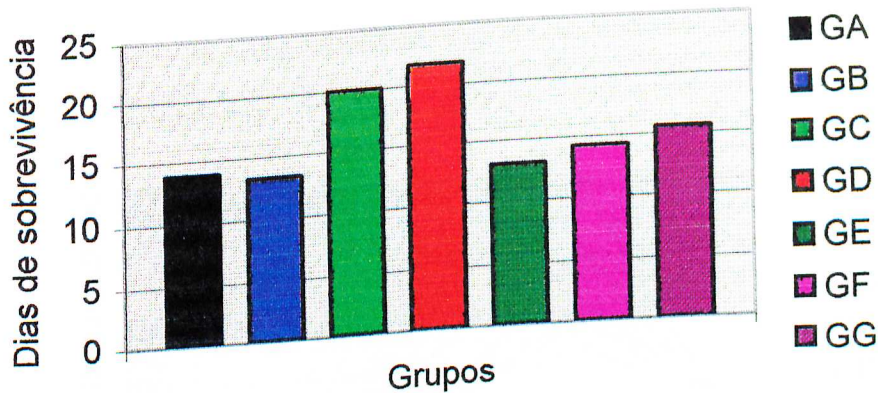
Para avaliar qual a melhor dose de EAP via oral foram analisadas seis diferentes concentrações. Houve diferença significativa entre os grupos GG e GB, GC e GD no 7º dia após a infecção ( $p < 0,05$  ANOVA-TUKEY). A melhor dose foi a do grupo C (153,8 mg/kg) reduzindo 81,9% da parasitemia, em relação ao grupo controle. Os dados são ilustrados na figura 3. Não houve diferença significativa na sobrevivência dos animais tratados, como representado na figura 4.



\* = diferença significativa ( $p < 0,05$ - ANOVA/ TUKEY)

**Figura 3** -- Determinação da curva dose-efeito para o Extrato Aquoso de Própolis (EAP), administrado pela via oral, sendo GA: tratado com dose de 38,5 mg/kg; GB: tratado com 76,9 mg/kg; GC: tratado com 153,8 mg/kg; GD: 307,7 mg/kg; GE: 615,4 mg/kg; GF: 1230,7 mg/kg e GG: controle.

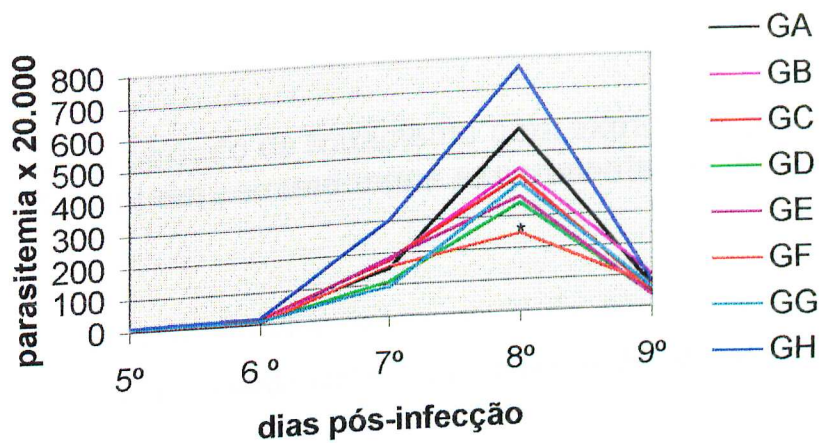




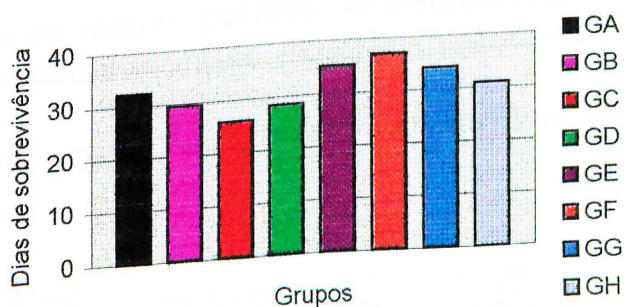
**Figura 4** -- Efeito do tratamento com EAP, via oral, sobre o tempo de sobrevivência dos animais experimentalmente infectados com *T. cruzi*, sendo GA: tratado com dose de 38,5 mg/kg; GB: tratado com 76,9 mg/kg; GC: tratado com 153,8 mg/kg; GD: 307,7 mg/kg; GE: 615,4 mg/kg; GF: 1230,7 mg/kg e GG: controle.

#### 4.9 Determinação da curva dose-efeito do EAP aplicado por via intraperitoneal, em diferentes concentrações

Houve diferença significativa entre os grupos GH (controle) e o GF no 8º dia após a infecção ( $P < 0,05$  ANOVA-TUKEY). A melhor resposta foi dada pelo grupo F (924,8 mg/kg) reduzindo 68,6%, em relação ao grupo controle (Figura 5). Não houve diferença significativa na sobrevivência dos animais tratados, como representado na Figura 6.



**Figura 5** -- Curva dose-efeito do extrato aquoso de própolis (EAP) , administrado via intraperitoneal , sendo GA: tratado com a dose de 28,9 mg/kg; GB: tratado com 57,85 mg/kg; GC: tratado com 115,6 mg/kg; GD: tratado com 231,2 mg/kg; GE: tratado com 462,4 mg/kg; GF: 924,8 mg/kg; GG: tratado com 1849,6 mg/kg; GH: controle. \* = diferença significativa ( $p < 0,05$ ) ANOVA/TUKEY



**Figura 6** -- Efeito do tratamento com EAP, via intraperitoneal, sobre o tempo de sobrevivência dos animais experimentalmente infectados com *T.cruzi*, GA: tratado com a dose de 28,9 mg/kg; GB: tratado com 57,85 mg/kg; GC: tratado com 115,6 mg/kg; GD: tratado com 231,2 mg/kg; GE: tratado com 462,4 mg/kg; GF: 924,8 mg/kg; GG: tratado com 1849,6 mg/kg; GH: controle.

#### 4.10 Avaliação do período de tratamento com extrato de própolis, via oral (15, 10, 5 dias) em camundongos experimentalmente infectados com *T. cruzi*

Quanto à parasitemia, pudemos observar que no 7º dia pós-infecção ocorreu uma diferença significativa apenas quando adotava-se o tratamento de 5 dias (Fig. 7).

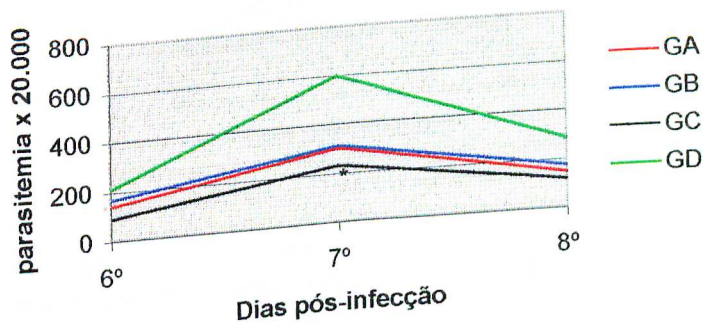


Figura 7 -- Avaliação do melhor período de tratamento, via oral, (5, 10 e 15 dias), sendo GA: tratado durante 15 dias; do GB: tratado durante 10 dias, GC: tratado durante 5 dias, todos os animais receberam na dose de 153,8 mg/kg. \* = diferença significativa ( $p < 0,05$ ) ANOVA/TUKEY.

#### 4.11 Avaliação do melhor período de tratamento, intraperitoneal (5, 10 e 15 dias) em camundongos experimentalmente infectados com *T. cruzi*

Quanto à parasitemia, apenas com 5 dias de tratamento houve diferença significativa, no 7º dia pós-infecção (Fig. 8).

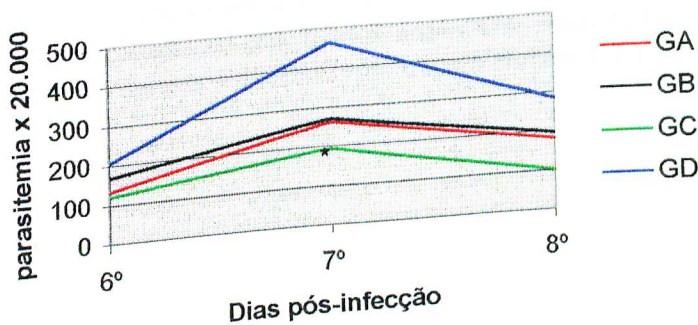
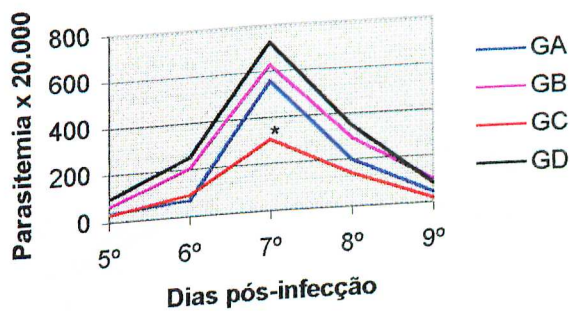


Figura 8 -- Avaliação do melhor período de tratamento, via intraperitoneal (5, 10 e 15 dias), sendo GA: tratado durante 15 dias; GB: tratado durante 10 dias, GC: tratado durante 5 dias. Todos os animais receberam a dose de 924,8 mg/kg. \* = diferença significativa ( $p < 0,05$ ) ANOVA/TUKEY.

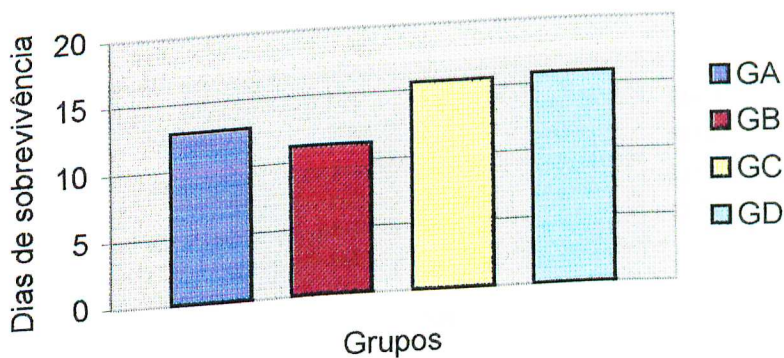


#### 4.12 Avaliação da eficácia do pré- tratamento , via oral, aos 7, 3 e 1 dia antes da infecção

Os animais pré- tratados tiveram redução significativa da parasitemia apenas no grupo C (pré-1 dia) no sétimo dia após a infecção. ( Figura 9). A mortalidade não foi significativamente diferente à grupo controle (Figura 10).



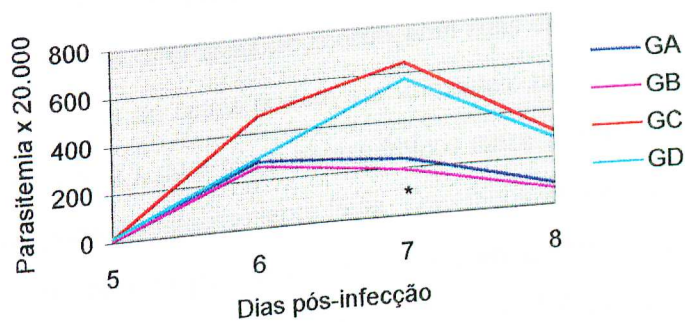
**Figura 9** -- Efeito do pré-tratamento sobre a parasitemia dos animais, via oral, com EAP aos 7, 3 e 1 dia antes da infecção experimental com *T. cruzi*, sendo: GA: pré-tratado durante 7 dias antes da infecção; GB: pré-tratado durante 3 dias; GC: pré-tratado durante 1 dia e GD: grupo controle (apenas água). \* = diferença significativa ( $p < 0,05$ ) ANOVA/TUKEY.



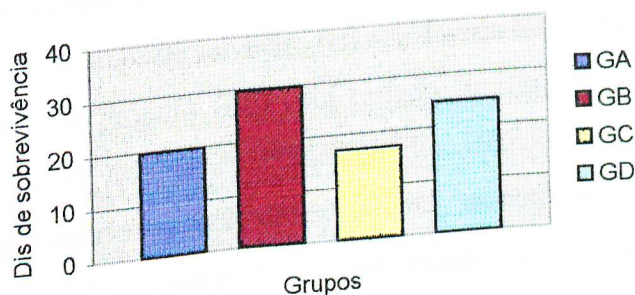
**Figura 10** -- Efeito do pré-tratamento sobre a mortalidade dos animais, via oral, com EAP aos 7, 3 e 1 dia antes da infecção experimental com *T. cruzi*, sendo: GA: pré-tratado durante 7 dias antes da infecção; GB: pré-tratado durante 3 dias; GC: pré-tratado durante 1 dia e GD: grupo controle (apenas água).

#### 4.13 Avaliação da eficácia do pré- tratamento, via intraperitoneal, aos 7, 3 e 1 dia antes da infecção

Os animais pré- tratados tiveram redução significativa da parasitemia apenas no grupo B ( pré-3 dia) no sétimo dia após a infecção.( ver Figura 11). A mortalidade não foi significativamente superior ao grupo controle.( Figura 12)



**Figura 11** -- Efeito do pré-tratamento sobre a parasitemia dos animais, via intraperitoneal, com EAP aos 7, 3 e 1 dia antes da infecção experimental com *T.cruzi*, sendo: GA: pré-tratado durante 7 dias antes da infecção; GB: pré-tratado durante 3 dias; GC: pré-tratado durante 1 dia e GD: grupo controle. \* = diferença significativa ( $p < 0,05$ ) ANOVA/TUKEY.



**Figura 12** -- Efeito do pré-tratamento sobre a mortalidade dos animais, via intraperitoneal, com EAP aos 7, 3 e 1 dia antes da infecção experimental com *T.cruzi*, sendo: GA: pré-tratado durante 7 dias antes da infecção; GB: pré-tratado durante 3 dias; GC: pré-tratado durante 1 dia e GD: grupo controle



## 5. DISCUSSÃO

Durante a fase de elaboração do experimento deve-se conhecer, com precisão, a classificação das cepas de *Trypanosoma cruzi* utilizadas. Isso é importante por haver linhagens de *T. cruzi* com diferenças de acordo com suas características morfológicas e patogênicas. Vários tipos de cepas podem ser utilizadas: tipo I, inclui cepas de rápida multiplicação (ex: cepa Y), com picos parasitêmicos entre 7º e 12º dia da infecção; tipo II, cepas com multiplicação relativamente lenta, com picos parasitêmicos entre 12º e 20º dia de infecção (ex: São Filipe); tipo III cepas com multiplicação lenta (ex: cepa Colombiana), com picos parasitêmicos entre o 20º e o 30º dia após a infecção. No presente trabalho, utilizou-se a cepa Y devido ao seu desempenho e respostas em ensaios biológicos tanto "in vitro" quanto "in vivo" (Andrade, 1974, 1985 apud Silva, 1999).

A primeira parte do presente trabalho consistiu em verificar qual o melhor extrato de própolis a ser utilizado para a pesquisa da redução da parasitemia e do tempo de sobrevivência dos animais na fase aguda da doença de Chagas. Foram analisados extratos de própolis dissolvidos em três tipos de solventes (etanol, Tween 80 e água).

O extrato etanólico de própolis (EEP) foi testado "in vitro" (tabela 5) para posteriormente ser testado "in vivo". Os resultados obtidos, inicialmente, demonstraram que o grupo controle apresentava ausência de parasitemia, caracterizando interferência do etanol a 80% nos resultados obtidos. Essa concentração de etanol foi escolhida baseada em trabalho realizado por Park & Ikegaki (1998), que descreve ser essa concentração de etanol que extrai o maior volume de composto da própolis bruta.

Partiu-se, então, para o experimento (tabela 6) em que foram testados tratamentos com etanol a 10%, 20% e 40%, e essas concentrações, também, interferiram nos resultados finais, o que nos levou a descartar o extrato etanólico como solução para tratamento nos experimentos posteriores.

Na busca de extratos que fossem solúveis em água, utilizaram-se duas metodologias de preparo do mesmo: uma utilizando Tween 80 (polissorbato 80) a 5% e outra utilizando somente água. A primeira foi desenvolvida em nosso laboratório, em experimentos anteriores e a segunda adaptada de Matsushige et al. (1996).



O extrato tweenólico de própolis (ETP) foi avaliado "in vivo" comparado ao extrato aquoso de própolis (EAP), como representado na Figura 1, demonstrando que, "in vivo", ambos produzem uma redução significativa no 7º dia pós-infecção. A análise estatística mostrou que não houve diferenças significativas entre os grupos: A (recebendo EAP), B (recebendo ETP) e C (recebendo Tween 80, 5%), porém, notou-se que os animais do grupo D (recebendo apenas água) apresentaram uma parasitemia maior que os outros grupos. Apartir disso, deduziu-se que unicamente o Tween 80 interferiu nos resultados e, por isso, optou-se pelo EAP, por ser formulado com solvente mais inerte que o ETP para os experimentos realizados "in vivo".

Devido ao fato de inocularmos o EAP via intraperitoneal "in vivo", realizamos testes de esterilidade por meio de dois testes microbiológicos :TSA e TSB, constatando-se que o EAP na concentração de 1,0 g/ml inibe o crescimento de microorganismos, diferindo das concentrações de 0,5 e 0,1 g/ml, que permitiram o crescimento de bacilos gram-positivos e leveduras no meio, assim adotou-se o procedimento de estocar o EAP na maior concentração e diluí-lo nas doses desejadas apenas momentos antes do tratamento dos animais.

Realizaram-se dois experimentos "in vitro" para obter mais dados: um com EAP (tabela 3) e ETP (tabela 4) ambos com diferentes concentrações. Verificou-se que o EAP apresentou um melhor desempenho por apresentarem resultado negativo ao teste do microhematócrito e a mistura contendo 1,0 g/ml demonstrar, após inoculação, incapacidade de provocar infecção em animais normais. O mesmo não foi observado em concentrações maiores de ETP, 0,8 e 1,0 g/ml, testadas que apresentaram resultado positivo ao teste do microhematócrito, realizado nos tubos onde a parasitemia não foi detectada no exame de sangue entre lâmina e lâminula.

Esses dados estão de acordo com Higashi & De Castro (1994) que constataram que a própolis, na forma de extrato etanólico e dissolvido em DMSO (Dimetilsulfóxido) era ativa contra as três formas do parasita ( tripomastigota, epimastigota e amastigota), "in vitro". No presente trabalho, um comportamento dose-dependente para a inibição das formas evolutivas do *T.cruzi*. também foi observado. Os autores acima relatam que, talvez, certos constituintes da própolis podem intensificar os mecanismos de ativação celular, levando a um aumento da destruição dos amastigotos intracelulares.

Assim, pesquisou-se a interferência do período de pré-incubação dos experimentos "in vitro" e se havia participação do sistema óxido nítrico. No primeiro experimento (tabela 7), o resultado positivo a zero hora de pré-incubação, quando os tubos foram analisados nas 24 e 48 horas após a infecção, indica que apesar de haver uma ação direta, expresso pela redução dos parasitas nesse experimento, há a necessidade de uma pré-incubação para zerar a contagem de parasitas no sangue contido nos tubos, indicando uma possível influência dos processos de ativação celular.

No próximo experimento avaliou-se a influência do sistema óxido nítrico por meio de dois inibidores da enzima que converte a L-arginina em óxido nítrico na célula, a NO sintase. Os resultados obtidos indicaram uma ação sobre o *T.cruzi* independente do sistema óxido nítrico, nos experimentos "in vitro" (tabela 8). Os possíveis mecanismos de ação são: ação direta sobre o parasita ou alguma outra via de imunoestimulação independente de NO, como a formação de  $H_2O_2$ .

Com o objetivo de verificar a influência do sistema óxido nítrico no mecanismo de ação da própolis, foi realizado experimento "in vivo" com L-arginina, administrada, via intraperitoneal, na concentração de 500 mg/kg, em associação com EAP, nas doses de 689,6 mg/kg, 1379 mg/kg e 2758 mg/kg (respectivamente grupos A, B e C) e apenas com L-arginina (grupo D). Os dados obtidos foram: diminuição significativa da parasitemia no 7º dia nos grupos B e C em relação ao grupo D (controle); aumento do tempo de sobrevivência dos grupos B e C. Esses dados sugerem um mecanismo de ação "in vivo", que envolve o sistema óxido nítrico, diferindo dos resultados obtidos "in vitro" e demonstrados na Tabela 8. Dados não apresentados.

Foi pesquisado, ainda, qual a melhor dose para o tratamento dos camundongos infectados com *T.cruzi*. Utilizamos a determinação da curva dose-resposta para a via oral e intraperitoneal, respectivamente mostradas nas figuras 3 e 5.

No experimento via oral (figuras 3 e 4) constatou-se que apenas as doses inintermediárias são mais eficientes, em ordem decrescente de efeito redutor da parasitemia: 153,8 mg/kg, 307,7 mg/kg e 76,9 mg/kg, sendo que a primeira dose reduziu 81,9% da parasitemia, em relação ao grupo controle, representado nas figuras 3 e 4. Cabe destacar o comportamento observado, cuja a maior dose não correspondeu ao melhor efeito.

O mesmo é observado no experimento via intraperitoneal (Figura 5), o qual apresentou uma redução significativa da parasitemia no 8º dia pós-infecção, na dose de



1230,0 mg/kg, reduzindo 68,6%, em relação ao grupo controle. O aumento do tempo de sobrevivência dos grupos de animais com menor parasitemia também foi constatado (Figura 6).

Esses dados estão de acordo com Orsi et al. (2000), que avaliaram o efeito da própolis sobre a ativação de macrófagos pela determinação dos metabólitos do oxigênio ( $H_2O_2$ ) e óxido nítrico (NO), constatando que a própolis induz a produção de NO e  $H_2O_2$ , por uma via dose dependente, inibindo significativamente a geração desses quando aplicada em altas doses.

Deve-se ressaltar a importância da determinação de uma curva dose resposta para analisar o comportamento dose –dependente nos modelos animais para o estudo da doença de Chagas.

Os presentes dados estão em desacordo com De Castro et al. (1995). Nesse trabalho, diferentes formulações de própolis foram administradas em camundongos experimentalmente infectados com *Trypanosoma cruzi* (cepa Y) e a parasitemia e a taxa de sobrevivência foram monitoradas. A administração oral de extrato etanólico de própolis superior a 12 gramas de própolis/ kg por dia ou própolis oferecida *ad libitum* na água de ingestão (superior a 4 g/kg/dia) ou na alimentação (superior a 5g/kg/dia) não interferiram em ambos os parâmetros. A diferença dos nossos resultados para os do referido trabalho ,talvez, deva-se a dose administrada , via oral, visto que o extrato aquoso de própolis em doses altas possui um efeito inibidor sobre a ativação macrofagocitária. Outro fator que pode ter influenciado a discordância nos resultados foi a forma de administração, sendo que a propólis foi disponibilizada aos animais no referido trabalho, utilizando a água de ingestão, administrada na ração e através de gavagem. As duas primeiras formas sofrem influência do curso da infecção. No laboratório, os camundongos infectados diminuíram a ingestão de água e comida ao longo da fase aguda, chegando ao estado de inanição próximo aos dias em que o animal vem a óbito. Portanto, a ingestão de própolis tende a variar quando essa é administrada na bebida e na ração.

Outro ponto a ser destacado nas curvas dose-efeito determinadas é a diferença da dose ótima verificadas por administração via intraperitonal e via oral. Foi necessária uma maior dose via intraperitonal para produzir uma redução significativa quando comparado à via oral.



Um fator que pode ser determinante para essa variação é o peso dos animais e outro é a absorção de flavanóides, um dos componentes da própolis, descrito na literatura como uma classe de polifenóis com ação tripanomicida (ibid.1995).

Nos vegetais, flavanóides ocorrem naturalmente como O-glicosídeos, com um açúcar ligado na posição C-3. Durante a coleta de própolis, as abelhas a misturam com saliva, que contém uma enzima 1,3  $\beta$ -glicosidase. Essa enzima promoverá a liberação da molécula de açúcar, transformando flavanóides glicosilados em flavanóides agliconas Bonhevi et al. apud Park et al.(1998b). Apenas flavanóides agliconas podem atravessar a parede intestinal de animais mamíferos. Nenhuma enzima que pode quebrar as ligações B-glicosídicas é secretada no intestino ou na parede intestinal de animais, portanto a hidrólise apenas ocorre no intestino grosso devido à ação da microflora (MORAND et al. ,1998). Assim é possível que em um ambiente asséptico , no caso a cavidade peritoneal é necessário uma dose maior de própolis para obter o efeito redutor da parasitemia.

Foram analisados diferentes períodos de tratamento com o EAP para as melhores doses determinadas pelas curvas dose-efeito, via oral e intraperitoneal, durante 5, 10 e 15 dias pós infecção (figura 7 e 8). Constatou-se que o período de 5 dias de tratamento foi onde ocorreu uma significativa redução da parasitemia dos animais tratados.

Em outro experimento realizado, avaliou-se a eficácia do pré-tratamento durante 7, 3, 1 dia antes da infecção, respectivamente pelas vias oral e intraperitoneal, sendo que a primeira mostrou redução significativa com 24 horas de pré-tratamento antes e a segunda com 3 dias de pré-tratamento (figura 9 e 11) e sendo esses dados refletidos no aumento da mortalidade (figura 10 e 12). Essa diferença pode ser devida às diferenças de absorção de flavanóides citadas anteriormente como, também, à influência inibitória da própolis sobre a ativação de macrófagos em maiores concentrações, que se expressam em maior número de parasitas.

A própolis possui baixa toxicidade aguda, medida pela dose letal mediana ( $DL_{50}$ ) que se refere ao valor da última dosagem de uma determinada substância que é capaz de matar 50% dos animais que a receberam. A  $DL_{50}$  via oral da própolis, varia de 2000 a 7340 mg /kg (Burdock, 1998; Hrytsenko et al., 1977; Arvouet-Grand et al.,1993). Para o extrato etanólico de própolis, foi encontrada  $DL_{50}$  , via endovenosa, de 920 mg/kg (Moroni, 1998).

Outro parâmetro para avaliar a toxicidade é o bioensaio da substância em *Artemia salina*, um crustáceo da ordem Anostraceae, que vive em águas salobras de todo mundo, também denominado na literatura de “Brine Shrimp Test”, que se baseia na Concentração Letal Média (CL50) como parâmetro da atividade biológica. A própolis, na forma de extrato aquoso, apresenta uma CL50 de 1mg/ml (Lopes, 2000). A classificação de toxicidade para a CL50 é:  $<80 \mu\text{g/ml}$  = altamente tóxicos; entre 80 e 250  $\mu\text{g/ml}$  = moderadamente tóxico e maior que 250  $\mu\text{g/ml}$  = baixa toxicidade ou atóxico. Portanto a própolis encaixa-se na terceira categoria. Dolabela apud Lopes(2000).

Apesar de apresentar baixa toxicidade aguda, a própolis apresentou uma toxicidade crônica, evidenciada pelo seu efeito dose-dependente e aumento da parasitemia quando administrada, em pré-tratamento, em períodos maiores que 1 dia (via oral) e 3 dias (via intraperitoneal), conforme Figuras 9 e 11 ou em períodos de tratamento maiores que 5 dias (Figuras 7 e 8) evidenciando um efeito cumulativo que talvez diminua a produção de NO e  $\text{H}_2\text{O}_2$  nos macrófagos, mecanismo essencial para desencadear e modular a resistência do hospedeiro ao parasita. (Gazzinelli et al., 1998). Portanto a própolis possui uma certa toxicidade e mais estudos devem ser realizados “in vitro” e “in vivo”, para que se possa validar a própolis e seus extratos, tão comumente utilizados pela população em geral, com o objetivo de tornar-se fonte de novos quimioterápicos.

No contexto descrito acima, a própolis tem um enorme potencial por apresentar vários compostos químicos líderes e pela grande quantidade de compostos presente na sua constituição com inúmeros relatos de atividade biológica (conforme descrito na Introdução). O fracionamento desses compostos direcionados pela atividade biológica se faz necessário, devido aos resultados obtidos nesse trabalho e em De Castro et al. (1995), em que os autores descrevem na discussão que flavanóides fracionados da própolis apresentaram alta atividade anti-*T. cruzi*.

Estudos preliminares realizados sugerem que a solução aquosa de quercetina, um dos flavonóides encontrados na própolis possui ação anti-*T. cruzi* “in vitro” e “in vivo”(dados não apresentados).

Outra pesquisa que poderá ser conduzida com a própolis é o tratamento de cepas de *Trypanosoma cruzi* resistentes ao benzonidazol e ao nifurtimox. Foi descrito em *T. cruzi* a presença de sequências homólogas aos genes codificadores das glicoproteínas P



(PgP) associadas com a resistência, denominada *tcpgp2* (Dallagiovanna et al., 1995). Superexpressão das P-glicoproteínas (PgP) media a resistência a quimioterapia em células cancerosas, principalmente por uma glicoproteína transportadora *ATP-binding cassette* (ABC) localizada na membrana plasmática a qual elimina as drogas citotóxicas as custas da hidrólise de ATP. PgP consiste de duas porções homólogas que contém um domínio transmembrânico e um domínio citosólico ligante de nucleotídeo (NBD) o qual contém dois motivos consensos Walker, A e B, envolvidos na ligação de ATP e hidrólise. Flavanóides ligam-se fortemente aos NBD's, com alta afinidade, modulando a resistência à quimioterapia (Di Pietro et al., 1999). Foi demonstrado haver correlação entre suscetibilidade à droga e polimorfismos de *tcpgp 2*, indicando um possível envolvimento da proteína codificada por esse gene na resistências ao Benzonidazol e Nifurtimox (Murta et al., 1998). O Extrato Aquoso de própolis é uma fonte de flavanóides agliconas como descrito por Bezzan (2000) e poderia ser utilizado no tratamento específico da doença de Chagas, concomitantemente, a essas drogas, com o objetivo de tornar cepas resistentes a esses quimioterápicos em cepas susceptíveis, diminuindo a quantidade empregada dos mesmos e aumentando sua eficácia.



## 6. CONCLUSÃO

- Extrato aquoso de propólis (EAP) apresentou maior ação tripanomicida “in vitro” do que o extrato tweenólico de propólis (ETP).
- Todas as concentrações de etanol testadas mostraram influência nos experimentos “in vitro”, não sendo possível, portanto, determinar a ação do extrato etanólico de propólis (EEP).
- EAP atua por um mecanismo independente do sistema óxido nítrico “in vitro”
- EAP é mais eficaz para redução da parasitemia e mortalidade de camundongos experimentalmente infectados com *T. cruzi*, quando comparado ao extrato tweenólico de propólis (ETP)
- Período de pré-tratamento com extrato aquosos de propólis, mostrou resultado significativo com administração 24 horas, via oral e 72 horas, via intraperitoneal.
- O período de tratamento mais eficaz para redução da parasitemia é de 5 dias para ambas as vias de administração (oral e intraperitoneal), quando comparado com 10 e 15 dias de tratamento.
- As doses de 153,8 mg/kg de EAP(via oral) e 1230,0 mg/kg (via intraperitoneal), reduziram, respectivamente, 81,9% e 68,6% da parasitemia em relação ao grupo controle.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- AMOROS, M; SIMÕES, C. M. O.; GUIRRE, L.; SAVVAGER, F.; CORMIER, M. Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type I in cell culture; comparison with the antiviral activity of propolis. **Journal of Natural Products**. v. 55, n.12, p.1732-1740. 1992.
- APT, W.; AGUILEIRA, X.; ARRIBADA, A.; PÉREZ, C.; MIRANDA, C.; SÁNCHEZ, G.; CORTÉS, P.; RODRIGUEZ, J.; JURI, D. Treatment of cronic Chagas disease with itraconazole and allopurinol. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, v.59, n.1, p.133-138.1998.
- ARAI, S.; KURIMOTO, M. Biological effects of propolis on macrofage function and tumor metastasis. **Honeybee-Science**. v. 5, n.4, p.155-162. 1994.
- ARAÚJO-JORGE, T.C. The biology of *Trypanosoma cruzi* – macrophage interaction. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.84, n.4, p 441-462. 1989.
- AZEVEDO, R. V. P.; KOMESU, M.C.; CANDIDO, R.C.; SALVETTI, C.; REZENDE, I. H. C. *Candida* sp in the oral cavity with and without lesions: maximal inhibitory dilution of Propolis and Periogard. **Revista de Microbiologia**, v. 30, n.4, p?, Oct/Dec. 1999.
- BANKOVA, V. S., DYULGEROV, A. L. POPOV, S. and MAREKOV N. S. Study of propolis fenolic constituents. **Zeitschrift fur Naturforschung**, v. 42, p.147-151. 1987.
- BANKOVA, V.; CRISTOV, R.; MARCUCCI, C.; POPOV, S. Constituent of Brazilian Geopropolis. **Z.Natursch**. v. 53, p. 402-406. 1998a.
- BANKOVA, V., BOUDOROVA-KRASTEVA, G., POPOV, S.; SFORCIN, J.M.; FUNARI, S.R.C. Seasonal variations of chemical composition of Brazilian propolis. **Apidologie**, v. 29, p. 361-367. 1998b.

- BANSKOTA, A.H.; TEZUKA, Y.; PRASAIN, J.K.; MATSUSHIGE, K.; SAIKI, I.; KADOTA, S. Chemical constituents of brazilian propolis and their cytotoxic activities. **J. Nat. Prod.** v.61, p. 896-900. 1998.
- BASNET, P.; MATSUSHIGE, S.; HASE, K.; KADOTA, S.; NAMBA, T. Potent antihepatotoxic activity of dicaffeoyl quinic acids from propolis. **Biol. Pharm. Bull.** v.19, n.4, p.655-657. 1996.
- BUHATEL, T. Investigation on Dermatophilus infection in pigs. **Buletinul Institutului Agronomic. Cluj Napoca. Seria Zootehnie si Medicina Veterinaria.** v. 46, p. 223-228. 1992.
- BASTOS, E.M.A. Origem botânica, propriedades físico-químicas e atividade antimicrobiana da própolis verde produzida em Minas Gerais. **Anais do IV Encontro sobre Abelhas**, Ribeirão Preto, p. 233-238. 2000.
- BEZZAN, L.C.F. Contribuição ao estudo dos constituintes químicos da própolis de **Eucalyptus urophylla** da região do triângulo mineiro: 2000, 59p. Dissertação (mestrado). Instituto de Química-Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.
- BURDOCK, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (PROPOLIS). **Food and Chemical Toxicology**, v.36, n.4, p.347-363.1998.
- CAFARCHIA, C.; DE LAURENTIS, N.; MILIUO, M. A.; LOSACCO, V.; PUCCINI, V. Antifungal activity of Apulia region propolis. **Parasitologia**, v.41, n.4, p.587-590, Ded. 1999.
- CHAUVIN, R. The signal for reconstruction in bee colonies: the "spirit of the live" and Darclun's work. **Comptes-Rendus-de-l'Academie-des-Sciences. Série III, Sciences-de-la-Vie.** v. 314, n. 8, p. 361-363. 1992.
- CHENG, P.C.; WONG, G. Honey bee propolis: prospects in medicine. **Bee World**, v.77, n.1, p 8-15.1996.



- COVER, B.; GUTTERIDGE, W.E. A primary for drugs to prevent transmission of Chaga's Disease during blood transfusion. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.76, p.50-57, 1982
- CRANE, E. **O livro do mel**. São Paulo, Nobel, 1983. 226 p.
- CROFT, S. L. Pharmacological Approaches to antitrypanosomal chemotherapy. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.94, n.2, p. 215-220, Mar/Apr. 1999.
- CROFT, S. L. The current status of antiparasite chemotherapy. **Parasitology**, v.114, p. 53-515. 1997.
- CUNHA-NETO, E.; KALIL, J. Autoimunidade na doença de Chagas. **Revista da Sociedade de Cardiologia do estado de São Paulo**. São Paulo, v.4, n.2, p. 92-100, mar/abr. 1994.
- DALLAGIOVANNA, B.; GAMARRO, F.; CASTANYS, S. Molecular characterization of a P-glycoprotein related *tcpgp2* gene in *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.75, p. 145-157. 1996.
- DE CASTRO, S. S., MEIRELLES, M. N. L. and OLIVEIRA, M. M. *T. cruzi*: adrenergic modulation of camp role in proliferation and differentiation in vitro. **Experimental Parasitology**, v. 64, p. 368-375. 1987.
- DE CASTRO, S. L. The challenge of Chaga's disease chemotherapy; An update of drugs assayed against *T. cruzi*. **Acta Tropical**, v. 53, p. 83-98. 1993.
- DE CASTRO, S.L.; HIGASHI, D. O. Effect of different formulations of propolis on mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.46, p. 55-58. 1995.
- DE CASTRO, S. L.; SANTA-RITA, R.M.; EINICKEN-LAMAS, M. Quioterapia Experimental. In: ARAÚJO-JORGE, T.C.; DE CASTRO, S. L. **Doença de Chagas: Manual para experimentação animal**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz/Instituto Oswaldo Cruz, 2000.p.111-121.

- DE LANA, M.; TAFURI, W. L. *Trypanosoma cruzi*. In: NEVES, D. P.; DE MELO, A.L.; GENARO, O.; LINARDI, P.M. **Parasitologia Humana**. 9 ed. Ateneu, 1997. p.82-115.
- DE MOURA, L. P. P.; SCAPINELLO, C.; MARTINS, E. N.; FRANCO, S. L.; RIBEIRO, M. C. M. Efeito da solução hidroalcoólica de própolis e robenicina sobre a contagem de oocistos por grama de fezes de *Eimeria* spp em coelhos Nova Zelândia branco. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.27, n.2, p. 325-330.1998.
- DE SOUZA, W.; CARREIRA, I. P.; MIRANDA, K.; SILVA, N. L. C. Two special organelles found in *Trypanosoma cruzi*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.72, n.3, p.421-432. 2000.
- DIAZ, F. G. Nueva orientación terapéutica en el tratamiento conservador de la prostatovesucutitis crónica. Los productos de la colmena: nutrición, salud y belleza. **Apimondia**, v. 133. 1974.
- DIMITRESCU, M.; CRISAN, I.; ESANU, V. Antiherpetic activity of aqueous propolis extract. 2. Activity of lectins in aqueous propolis extract. **Revue Romaine de Virologie**. v. 44, n.1-2, p. 49-54. 1993.
- DIMITRESCU, M.; ESANU, V.; CRISAN, I. Antiherpetic activity of aqueous propolis extract 1. Antioxidant activity in cultures of human fibroblasts. **Revue Romaine de Virologie**. v. 43, n. 3-4, p. 165-173. 1992.
- DIMOV, V. B.; IVANOVSKA, N. D.; BANKOVA, V. S.; POPOV, S. S. Immunomodulatory action of propolis. VI. Influence of water soluble derivative on complement activity in vivo. **Journal of ethnopharmacology**. v. 47, n.3, p.145-147. 1995.
- DIMOV, V.; IVANOVSKA, N.; MANOLOVA, N.; BANKOVA, V.; NIKOLOV, N.; POPOV, S. Immunomodulatory of propolis. Influence on anti-infections protection and macrophage function. **Apidologie**, v. 22, n. 2, p. 155-162. 1991.



- GIRAL, T.; ACHONG, M.; RUIZ, M.; FERNANDEZ, S. Study of the protective effect of propolis in gastric lesion models induced by 96% ethanol and 0,1 M HCl in rats. **Ciencia y Tecnica en la Agricultura, Apiculture**, v. 6, p. 61-69. 1990.
- GONZALEZ, R.; REMIREZ, D.; RODRIGUEZ, S.; GONZALES, A.; ANCHETA, O.; MERINO, M.; PASCUAL, C. Hepatoprotective effects of propolis extract on parecetanol induced liver damage in mice. **Phytotherapy Research**, v. 8, n. 4, p. 229-232. 1994.
- GREENAWAY, W.; SCAYBROOK, T. and WHATLEY, F. R. The composition and plant origins of propolis: a report of work of Oxford. **Bee World**, v. 71, p.107-118. 1990.
- GUERRA, M. e UTIBE, A. I. Uso del propolio em Medicina humana. **I Simpósio sobre los Efectos del Propólio en la Salud Humana y Animal**. Varadero. p. 196-198. 1988.
- GUISALBERTI, E. L. Propolis: a review. **Bee World**, v. 60, p.59-84. 1979.
- GUISALBERTI, E. L., JEFFERIES, P. R., LANTERI, R. and MATISONS, J. Constituents of propolis. **Experientia**, v. 34, p. 157-158. 1978.
- GUTTERIDGE, W. E. New anti-protozoal agents. **International Journal of Parasitology**, v.17, p. 121-129. 1987.
- HAMMOND, D. J.; GUTTERIDGE, W.E. Purine and Pyrimidine metabolism in trypanosomatidae. **Molecular Biochemical Parasitology**, v.13, p. 243-261. 1984.
- HEGAZI, A. G.; EL BERDINY, F.; EL ASSILY, S.; HASSAN, N.; POBOV, S. Studies of some aspects of antiviral activity. 1. Influence of propolis on Newcastle disease virus. **Veterinaty. Medical Journal Giza**, v.41, n. 2, p. 53-56. 1993.
- HEMEIDA, H. H.; ABD-ALFATTAH, M. A. **Bulletin of Faculty of Agriculture, University of Cairo**, v. 44, n. 3, p. 649-662. 1993.
- HIGASHI, K. O. and DE CASTRO, S. L. Própolis extratos are effective against *Trypanosoma cruzi* and have an impact on its interaction with host cells, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 43, p. 149-155. 1994.



- HOFFMANN, F. L.; GARCIA-CRUZ, C.H.; CARMELLO, M.T.; DUTRA, A.L.; VINTURIM, T.M. Determinação da atividade antimicrobiana "in vitro" de três produtos farmacêuticos à base de própolis. **Higiene Alimentar**, v.12,n.53, Janeiro/Fevereiro. 1998.
- HOLLANDS, J.; MANDADO, S.; DOMINGUEZ, C. Ultrastructural demonstration of the cytoprotective effect of própolis against alcohol in mice. **Revista Cubana de Ciências Veterinárias**, v. 22, n.2, p. 85-90. 1991.
- HÖLSCHER, C.; KÖHLER, G.; MÜLLER, U.; MOSSMANN, H.; SCHAUB, G.; BROMBACHER, F. Deceptive Nitric Oxide effector lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi* infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. **Infection and Immunity**, v.66, n.3, p. 1208-1215, 1998.
- HORVATH, D. A virtual screening approach applied to the search for Trypanothione reductase inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.40, n.15, p. 2412-2423.1997.
- IVANOVSKA, N. D.; DIMOV, V. B.; PAVLOVA, S.; BANKOVA, V. S.; POPOV, S. Immunomodulatory action of própolis. Anticomplementary activity of a water-soluble derivative. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 47, n. 3, p. 135-143. 1995.
- IVANOVSKA, N.; STEFANOVA, Z.; VALEVA, V.; NEYCHEV, H. Immunomodulatory action of propolis. VII. A Comparative Study on cinamic and caffeic acid lysine derivatives. **Comptes Rendus de l'Academie Bulgare de Sciences**, v. 46, n.10, p. 115-117. 1993.
- KALETA, E. F. Effect of honey bee (*Apis Mellifera*) propolis on the growth of small and large-plaque variants of pigeon herpes virus in vitro. **Tierärztliche Umschau**, v. 46, n. 9, p. 553-556, 1991.
- KERR, W. E. Native Brazilian bees (Meliponinae) as pollinators and as producers of honey, pollen, propolis and wax. **Informe-Agropecuário**, v.13, n.149, p.15-22. 1987.

- KOO, M.K.; PARK, Y.K. Investigation of Flavanoid Aglycones in propolis collected by two different varieties of Bees in the same region. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 61, n. 2, p. 367-369. 1997.
- KOSONOCKA, L. Propolis fortalece o sistema imunológico. **Rev. Bras. Apic**, v. 2, p. 22-24. 1991.
- KROL, W.; SCHELLER, S.; SHANI, J.; PIETZS, G.; CZUBA, Z. Synergistic effect of ethanolic extract of propolis and antibiotics on the growth of *Staphylococcus aureus*. **Arzneimittel-Forschung**, v.43-1, n. 5, p. 607-609. 1993.
- KUJUMGIEVA, A.; TSVETKOVA, I.; SERKEDJIEVA, Y.U.; BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; POPOV, S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Journal of ethnopharmacology**, v.64, p. 235-240. 1999.
- LOPES, W. B. **Padronização e desenvolvimento de um teste para detecção do potencial tóxico de extratos naturais utilizando-se larvas de *Artemia salina* Leach**, 2000. 30p. Monografia (graduação). Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.
- LORI, G. A. Fungicidal effect of propolis in bovine dermatomycosis. **Industria Apicola**, v. 1, n.1, p. 38-43. 1990.
- LUQUETTI, A. O. Etiological treatment for Chagas disease. Technical Report. Fundação Nacional da Saúde. **Parasitology Today**, v.13, p. 127-128. 1997.
- MARCUCCI, M.C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, v.26, p.83-99.1995.
- MARCUCCI, M.C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da propolis. **Química nova**, v.19, n.5, p.529-536.1996.
- MARR, J. J. Purine analogs as chemotherapeutic agents in leishmaniasis and American trypanosomiasis. **Journal Laboratory Clinical Medicine**, v.118, p. 111-119.1991.
- MATSUNO, T. Isolation and characterization of the tumoricidal substances from Brazilian propolis. **Honeybee-Science**, v. 13, n.2, p. 49-54. 1992.



- MATSUNO, T.; CHEN, C.; BASNET, P. A Tumoricidal and antioxidant compound isolated from an aqueous extract of propolis. **Med. Sci. Res**, v.25, p.583-584. 1997.
- MATSUSHIGE, K.; BASNET, P.; HASE, K.; KADOTA, S.; TANAKA, K.; NAMBA, T. Propolis protects pancreatic  $\beta$ -cells against the toxicity of streptozotocin (STZ). **Phytomedicine**, v.3, n.2, p. 203-209, 1996.
- MAZZUCO, H.; SILVA, R.D.M.; BERCHIERI, Jr.A.; OLIVEIRA, E. Utilização da própolis e álcool etílico no controle de Salmonella em rações avícolas. **Sci. Agric**, v.53, n.1, p.1-5, jan/abr. 1996.
- MENEZES, H.; BACCI Jr, M.; OLIVEIRA, S. D.; PAGNOCCA, F. C. Antibacterial properties of propolis and products containing propolis from Brazil. **Apidologie**, v.28, p. 71-76. 1997.
- MENEZES, H.; ALVAREZ, J.M.;ALMEIDA, E. Mouse ear edema modulation by different propolis ethanol extracts. **Arzneimittelforschung**, v. 49, n.8, p.705-707, Aug. 1999.
- MEYER, W. Propolis bees and their activities. **Bee World**, v. 37, p. 25-26, 1956.
- MIRAYES, C.; HOLLANDS, I.; CASTANEDA, C.; GONZALES, T.; FRAGOSO, T.; CURRAS, R.; SORIA, C. Therapeutic trial with the propolis based product Propolisina in human giardiasis. **Acta Gastroenterologica Latinoamericana**, v.18, n.3, p.195-202. 1988.
- MIYATAKA, H.; NISHIKI, M.; MATSUMOTO, H.; FUJIMOTO, T.; MATSUKA, M.; SATO, T. Evaluation of propolis (I): Evaluation of Brazilian and Chinese propolis by enzymatic and physico-chemical methods. **Biol. Pharm. Bull**, v.20, n.5, p.496-501. 1997.
- MIYATAKA, H.; NISHIKI, M.; MATSUMOTO, H.; FUJIMOTO, T.; MATSUKA, M.; ISOBE, A.; SATO, T. Evaluation of propolis (II): Effects of Brazilian and Chinese Propolis on Histamine release from rat peritoneal mast cells induced by compound 48/80 and Concanavalin A **Biol Pharm. Bull**, v. 21, n.7, p. 723-729. 1998.



MISIC, V. Lipid peroxidation of lecithin liposomes depressed by some constituents of propolis. **Fitoterapia**, v.62, n. 3, p. 215-220. 1991.

MOBUS, B. The importance of propolis to honeybees. **Br. Bee J**, v.100, p.198-199. 1972.

MORAND, C.; CRESPIY, V.; MANACH, C.; BESSON, C.; DEMIGNÉ, C.; RÉMÉSY, C. Plasma metabolites of quercetin and their antioxidant properties. **AJP-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 275, n.1, p.R212-R219, july. 1998.

MORONI, F. T. **A utilização do produto apícola própolis no tratamento da doença de Chagas**, 1998. 56p. Monografia (graduação). Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

MURTA, S.M.F.; GAZZINELLI, R. T.; BRENER, Z.; ROMANHA, A. J. Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benzonidazole and nifurtimox. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.93, p.203-214. 1998.

OKONENKO, L. B. Propolis as an inhibitor of lipid free-radical oxidation in salmonellosis. **Voprosy Meditsinskoi Khimii**, n. 32:3, p. 45-48. 1986.

OLIVEIRA, H.S.; SILVA, T.A.; BRANDEBURGO, M.I.H.; HAMAGUCHI, A. Efeito do extrato bruto liofilizado (EBL) de *Moringa olifera* (Moringaceae) na parasitemia de camundongos infectados experimentalmente com *Trypanosoma cruzi*. In: **Reunião Anual da SBPC**, Brasília-DF, Livro de resumos, p.100, resumo 4458-A10, 2000b, 190p.

OLIVEIRA, M.M.; EINICKER-LAMAS, M. Inositol metabolism in *Trypanosoma cruzi*: Potential target for chemotherapy against Chagas disease. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.72, n.3, sept.2000a.

ORSI, R. O.; FUNARI, S. R. C.; SOARES, A. M.V.C.; CALVI, S. A.; OLIVEIRA, S. L.; SFORCIN, J.M.; BANKOVA, V. Immuno-modulatory action of propolis on macrophage activation. **Journal of venomous animals and toxins**, v.6, n.2. 2000.

- PARK, Y.K.; KOO, M. H.; SATO, H.H.; CONTATO, J. L. Estudo de alguns componentes da própolis coletada por *Apis mellifera* no Brasil. **Arq. Biol. Tecnol**, v. 38, n.4, p. 1253-1259, dez. 1995.
- PARK, Y.K.; KOO, M. H.; IKEGAKI, M.; CONTADO, J.L. Comparasion of the flavanoid aglycone contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brazil. **Arq. Biol. Technol**, v.40, n.1, p. 97-106, march. 1997.
- PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; ABREU, J. A. S; ALCICI, N.M.F. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Ciência Tecnol. Aliment**, v.18, n.3, Aug/Oct. 1998b.
- PARK, Y.K.; KOO, M.H.,ABREU,J.A.;IKEGAKI, M.;CURY,J.A.; ROSOLEN, P.L. Antimicrobial activit of propolis on oral microornism. **Curr. Microbiol**, v.36, n.1, p.24-28, Jan.1998a.
- PARK, Y.K.; IKEGAKI, M. Preparation of water and ethanolic extracts of propolis and evaluation of the preparations. **Biosci. Biotechnol. Biochem**, v.62, n.11, p.2230-2232. 1998.
- PARK, E.H.; KAHNG, J. H. Suppressive effects of propolis in rat adjuvant arthritis. **Arch. Pharm. Res**, v. 22,n.6, p. 554-558, 1999.
- PASCUAL, C.; GONZALEZ, R.; TORRICELA, R. G. Scavenging action of propolis extract against oxygen radicals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 41, n.1-2, p. 9-13. 1994.
- PEREIRA, J. B.; WILLCOX, H. P. e COURA, J. R. Morbidade da doença de Chagas III. Estudo Longitudinal de Seis anos em Virgem da Lapa, MG, Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 80, n. 1, p.63-71. 1985.
- QUEIROZ, M. I.;BADIALE-FURLONG, E.; COELHO, C.S.P.; ZÍLIO, P.L.; CORREA, A.C. Avaliação do comportamento de oxidação de carne de pescado salgado tratado com própolis. **Boletim do centro de pesquisa e processamento de alimentos**, v.14, n.2, p. 273-282, jul/dez. 1996.



- RAO, C. V.; DESAI, D.; RIVENSON, A.; SIMI, B.; AMIN, S.; REDDY, B. S. Chemoprevention of colon carcinogenesis by phenylethyl-3-methylcaffeate. **Cancer Research Baltimore**, v. 55, n. 11, p. 2310-2315. 1995.
- REY, L. **Parasitologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 150-1. 1991.
- SCHLEMPER Jr, B. R.; ÁVILA, C. M.; COURA, J. R.; BRENER, Z. Course of infection and histopathological lesions in mice infected with seventeen *Trypanosoma cruzi* strains isolated from chronic patients. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.16, p. 23-30, Jan/Mar. 1983.
- SFORCIN, J. M.; FUNARI, S. R.C.; NOVELLI, E. L. B. Serum biochemical determinations of propolis treated rats. **Journal of Venomous Animals and toxins**, v.1, n.1, 1995.
- SEIFERT, M.; HASLINGER, E. Constituents of propolis II. **Liebigs-Annalen-der-Chemie**, p. 93-97. 1991.
- SERKEDJIEVA, J.; MANOLOVA, N.; BANKOVA, V. Anti-Influenza virus effect of some propolis constituents and their analogues. **Journal of Natural Products**, v.55, n.3, p. 294-297. 1992.
- SHEN-ZHIQIANG, Z. Q. Development and application of propolis adjuvant inactivated vaccine against chicken egg drop syndrome. **Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica**, v.28, n.6, p. 535-541. 1997.
- SHERLOCK, I. A. Parasitemia constante durante 24 horas consecutivas na infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 17, p. 137-144, Jul/Set. 1984.
- SIESS, M.; LEBON, A.; CANIVENC-LAVIER, M.; AMIOT, M.; SABATIER, S.; AUBERT, S.Y.; SUSCHETET, M. Flavonoids of honey and Propolis: characterization and effects on Hepatic Drug – Metabolizing enzymes and Benzo {a} pyrene-DNA binding in rats. **J. Agric. Food. Chem**, v.44, p 2267-2301. 1996.
- SILVA, P. **Farmacologia**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 1203, 1994.



- SILVA, R. M. G. **Efeito do extrato bruto de mandevilla veluntina (Apocinacea) na infecção de camundongos por *Trypanosoma cruzi***. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, Curso de Ciências Biológicas, 56 p. (Monografia, Bacharelado). 1996.
- SILVA, R.M.G. **Estudo da ação tripanomicida do extrato bruto de *Mandevilla velutina* em camundongos infectados com *Trypanosoma cruzi***: 1999, 58p. Dissertação (mestrado). Instituto de Genética e Bioquímica – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.
- SILVA, T. A.; OLIVEIRA, H.S.; FREITAS, F. G.; BRANDEBURGO, M. I.H.; HAMAGUCHI, A. Possível envolvimento de sistema óxido nítrico (NO) na ação tripanomicida “in vitro” do extrato bruto liofilizado (EBL) de *Ginkgo biloba*. Resumo In: **Reunião Anual da SBPC**, Brasília-DF, Livro de Resumos, p.100, resumo 4004-10, 2000, 190p.
- SUZUKI, I.; TAKAI, H.; KOIDE, M.; YAMAMOTO, H. Anti-tumor effect of immunoactive fractions from Brazilian water-soluble propolis, given in combination with an anticancer drug to mice bearing ehrlich carcinoma. **Honeybee-Science**, v. 17, n. 1, p. 1-6. 1996.
- TATEFUJI, T.; IZUMI, N.; OHTA, T. ARAI, S. TAEDA, M.; KURIMOTO, M. Isolation and identification of compounds of brazilian propolis wich enhance macrophage spreading and mobility. **Biol.Pharm.Bull.** 19(7), 966-970. 1996.
- TORRES, D.; HOLLANDS, I.; PALACIOS, E. Effect of an alcoholic extract of propolis on the in vitro growth of *Giardia Lamblia*. **Revista Cubana de Ciências Veterinárias**, v. 21, n.1, p. 15-19. 1990.
- URBINA, J. A.; PAYARES, G.; MOLINA, J.; SANOJA, C.; LEINDO, A.; LAZARDI, K.; PIRAS, M. M.; PIRAS, R.; PEREZ, N.; WINCKER, P.; RYLEY, J. F. Cure of short and long term experimental Chagas disease using DO870. **Science**, v. 273.n.16, p.969-971, August, 1996.
- URBINA, J. A. Parasitological cure of Chagas disease: Is it possible? Is it relevant? **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.94, p. 349-355.1999. Supplement I.

TUSHEVSKII, V. F.L POROKNYAK, L. A.; TIKHONOV, A. I.; BUDNIKOVA, T. M. Morphological aspects of the hepatoprotective effect of propolis tablets **Farmatsevtichnii-zhurnal**, n. 5, p. 70-71. 1991.

VANHALLEN, M. and VANHALLEN-FRASTÉ, R., Propolis: Origin, microscopical investigation, chemical constituents and therapeutical activity. **Journal Pharmacologie Belgique**, v.34, p. 253-259, 1979.

WILLIAMS, J. E. Leishmania and Trypanosoma. In: GILLESPIE, S.H.; HAWKEY, P. M. **Medical Parasitology: A practical approach**. IRL PRESS, 1995. P. 168-169.

WALDSCHMIDT, A. M., CAMPOS, L. A. O; DE MARCO Jr.,P. Genetic variability of behavior *Melipona quadrifasciata* ( Hymenoptera : Meliponinae). **Brazilian Journal of Genetics**, v. 20, n. 4. 1997.

WU, G.; MORRIS Jr, S. M. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. **Biochem. J**, v.336, p 1-17. 1998.

ZIMONJIC, D.L.; GRGA, D.; POPESKOVIC, D. Própolis induces decrease of mitotic activity, but does not affect SCE frequency in cultured human lymphocytes. **Acta Veterinaria**, v.39, p. 11-18. 1989.



## RESEARCH ON THE TRYPANOMICIDE ACTION OF PROPOLIS:

studies "in vitro" and "in vivo".

Chagas disease is one of the most important parasitic diseases of Latin America, due to its high incidence, prevalence and social-economical repercussion caused in the countries. Despite efforts, a very reduced number of drugs have been indicated for the specific treatment of the disease. All have side effects, are efficient for some strains and have restricted action in the acute phase of the disease. Studies performed "in vitro" showed that propolis preparations have high activity against *T. cruzi*, inhibiting proliferation in the host cell. The present study consists of characterizing the best solvent, pre-treatment and treatment period, extract dosage to reduce parasitism "in vitro" and "in vivo, survival time of Swiss mice infected  $5 \times 10^4$  infective forms of *T. cruzi* Y strain. Raw propolis from *Apis mellifera* (100g), from Patrocínio- MG was immersed in 500ml of deionized water, ground, and heated at 80° C for 120 minutes, filtered, dried and resuspended in desired concentrations, obtaining a propolis aqueous extract (EAP). The tweenolic propolis extract was obtained by immersing *Apis mellifera* propolis in 500ml 80 Tween (5%) in deionized water, in the same way as EAP was prepared. The ethanol propolis extract (EEP) was obtained by dissolving 100 gr. of the raw propolis in 80% ethanol (v/v), heated at 80% for 120 minutes, ground, filtered and evaporated on a hot grill at 75 ° C. The dry residue was resuspended in 80% ethanol (v/v) in desired concentrations. EAP was shown to be better than ETP in both "in vitro" and "in vivo" tests. EAP appeared to interfere in the "in vitro" tests due to the ethanol influence. EAP was administered in increasing doses intraperitoneally (up to 1849.6 mg/kg) and orally in *T. cruzi* infected mice. A reduced parasitism and increase of survival time were shown. Best doses were 153.8-mg/kg orally and 924.8 mg/kg intraperitoneally via. Reduction percentage was 81.9% orally and 68.6% intraperitoneal via. Previous treatment of animals with EAP dose of 153.8 mg/kg (orally) and 924.8 mg/kg (intraperitoneally) was efficient when performed 24 hours (orally) and 72 hours (intraperitoneally) before *T. cruzi* infection. The most efficient "in vivo" treatment period was 5 days for both ways of administration. To investigate the possible involvement of the nitric oxide system in the EAP action mechanism NOSi (L-NAME and NOARG) inhibitors were tested "in vitro" and showed that EAP possessed trypanomycide action even in the presence of inhibitors, indicating a nitric oxide independent mechanism. Results obtained in this study suggest that the aqueous propolis extract possesses component(s) able to act upon the parasitism of mice infected with *T. cruzi*, significantly reducing the number of parasites during infection by a dose dependent action mechanism. (Financial support: CAPES, PROPP/UFU and CNPq)