

UNIVERSIDADE TIRADENTES – UNIT
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE
MESTRADO EM SAÚDE E AMBIENTE

**EVIDÊNCIAS DE EFEITO HIPOLIPIDÊMICO DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO DE PRÓPOLIS VERMELHA EM RATOS**

MARCELLE FEITOSA PRATA

Aracaju
Março – 2018

UNIVERSIDADE TIRADENTES – UNIT
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE
MESTRADO EM SAÚDE E AMBIENTE

**EVIDÊNCIAS DE EFEITO HIPOLIPIDÊMICO DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO DE PRÓPOLIS VERMELHA EM RATOS**

Dissertação de Mestrado submetido à banca examinadora para a obtenção do título de Mestre em Saúde e Ambiente, na área de concentração Saúde e Ambiente.

MARCELLE FEITOSA PRATA

Orientadores

Prof. Dr. Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior

Prof^a. Dr^a. Francine Ferreira Padilha

Aracaju

Março – 2018

P912e Prata, Marcelle Feitosa
Evidências de efeito hipolipidêmico do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha em ratos / Marcelle Feitosa Prata ; orientação [de] Prof.º Dr.º Ricardo Luiz C. De Albuquerque Júnior, Prof.ª Dr.ª Francine Ferreira Padilha – Aracaju: UNIT, 2018.

69 f. il.; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) - Universidade Tiradentes, 2018
Inclui bibliografia.

1. Própolis. 2. Dislipemia. 3. Obesidade. I. Prata, Marcelle Feitosa. II. Albuquerque Junior, Ricardo Luiz C. De. (orient.). III. Padilha, Francine Ferreira (orient.). IV. Universidade Tiradentes. V. Título.

CDU: 606:638.135

SIB- Sistema Integrado de Bibliotecas

EVIDÊNCIAS DE EFEITO HIPOLIPIDÊMICO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE PRÓPOLIS VERMELHA EM RATOS

Marcelle Feitosa Prata

“DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDO À BANCA EXAMINADORA PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM SAÚDE E AMBIENTE, NA ÁREA DE CONCENTRAÇÃO SAÚDE E AMBIENTE.”

Aprovada por:

Ricardo Luiz Cavalcanti Albuquerque Júnior, Ph.D.
Orientador

Francine Ferreira Padilha, Ph.D.

Orientadora

Margarete Zanardo Gomes, Ph.D.
Universidade Tiradentes

Raquel Simões Mendes Netto, Ph.D.
Universidade Federal de Sergipe

Aracaju

Março – 2018

Epígrafe

“Não sei se a vida é curta ou longa para nós, mas sei que nada do que vivemos tem sentido, se não tocarmos o coração das pessoas.

Muitas vezes basta ser: colo que acolhe, braço que envolve, palavra que conforta, silêncio que respeita, alegria que contagia, lágrima que corre, olhar que acaricia, desejo que sacia, amor que promove.

E isso não é coisa de outro mundo, é o que dá sentido à vida. É o que faz com que ela não seja nem curta, nem longa demais, mas que seja intensa, verdadeira, pura enquanto durar.

Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”.

(Cora Coralina)

Dedicatória

Dedico essa dissertação aos meus pais que em meio às adversidades da vida sempre apoiaram os meus estudos e me proporcionaram a melhor educação. Amo vocês e sinto muito orgulho.

Agradecimentos

O encerramento de um ciclo proporciona reflexões sobre a trajetória percorrida e nesse momento é indispensável agradecer àqueles que nortearam a minha jornada durante o mestrado.

Em toda a minha vida, mas especialmente nessa fase, louvo e agradeço a Deus, todo poderoso, pela sua infinita bondade. As minhas orações foram acolhidas e transformadas em bênçãos sobre o meu caminho, nem sempre entendo o porquê de tantas lutas, mas a graça divina me basta e a fé é a luz que me conduz a vitória. A Nossa senhora das Graças, protetora e intercessora, sempre me amparando em todos os momentos.

A minha família que sempre acreditou em meus potenciais e não mediram esforços para me apoiar. A minha mami, Leidiene, que para mim é exemplo de persistência e coragem, obrigada por ser quem é, as suas orações foram essenciais. Ao meu pai, com seu jeitinho retraído e carinhoso sempre me apoiou em todos os desafios. Aos meus irmãos, Matheus e Marcos Fellipe, por estarem ao meu lado e fazerem parte das minhas conquistas. Ao meu noivo, Reges, agradeço pela compreensão nos momentos difíceis e por todo amor dedicado a mim. Sem dúvidas a sua presença tornou essa etapa mais tranquila. A Flavinha, por torcer pelos meus planos e projetos. A vovó Zilda e vovô Lucas, sempre atenciosos e prestativos, vocês são anjos em minha vida! Amo todos vocês.

Aos meus orientadores, Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior e Francine Ferreira Padilha, agradeço pelas oportunidades e pela confiança em meu trabalho. Em especial, ao acolhimento que o professor Ricardo me proporcionou no Laboratório de morfologia e patologia experimental (LMPE), o senhor é um docente exemplar, pois de forma incansável faz jus a sua escolha de ensinar e não abandona os seus alunos, muito obrigada pelos ensinamentos em minha formação. As professoras Patrícia Severino, Margarete Zanardo Gomes e Izabel Bezerra, pelas contribuições e preocupação com o desenvolvimento da minha dissertação.

Aos colegas do LMPE, Fany, Eli, Felipe, Angelinha, Gaby, Lorena, Rosenely, Amanda, Stefanie, Luiz, Lenon, Andréa, Rafa e Reynaldo pela boa convivência e apoio em todo o meu mestrado, juntos produzimos e aprendemos, mas também compartilhamos risadas, histórias e momentos de desespero, sem vocês teria sido muito mais difícil. As “pós-docs” Silvana Floresta e Luciana Nalone pela constante disposição em ajudar.

Aos amigos que o mestrado me proporcionou Ju, Mayana, Carlos e Bruno, irei lembrar com carinho da nossa parceria, das nossas conversas e principalmente da força nos dias difíceis.

Aos colegas da “turma de 7 meses”, nos unimos em prol do mesmo objetivo e as aulas durante a fase das disciplinas foram divertidas com vocês.

As amigas do grupo “As poderosas”, Lu, Ana Carla, Maraísa e Stefanie, vocês são pessoas do bem e a companhia de vocês alegrou a minha trajetória.

As minhas amigas Ju Almeida, Lorena Sant’anna, Lorena Melo, Isoka, Débora e Anna Maria por serem tão presentes em minha vida. Durante essa fase vocês compartilharam as minhas angústias e sempre me motivaram a seguir em frente. Amo vocês!

A Fernanda e a Mônica, por todo o carinho e compreensão. A torcida de vocês me manteve otimista no decorrer do mestrado e a confiança que vocês depositam em mim é fonte de inspiração para buscar mais conhecimento. Sinto um apreço imenso por vocês!

Ao coordenador do curso de Nutrição da Universidade Tiradentes Hugo Xavier que desde a graduação em Nutrição acompanha o meu desenvolvimento e durante o mestrado se manteve presente. Você representa para mim um grande incentivador, obrigada pelas oportunidades e atenção.

A Universidade Tiradentes, ao Instituto de tecnologia e pesquisa (ITP), LMPE e ao Unitlab por viabilizar toda a estrutura para o desenvolvimento dessa pesquisa. A professora Adriana de Oliveira Guimarães e a professora Sandra Araújo Souza pelo acompanhamento nas análises biomédicas.

Aos funcionários do biotério, Júlio, Marcos e Carlos, por me ajudarem na fase experimental com os animais, muito obrigada.

Ao Laboratório de Ensaio farmacêuticos e toxicidades (LeFT-UFS) pela parceria nesse estudo.

Por fim, agradeço a todos que de alguma de forma direta ou não, contribuíram com a minha dissertação.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	10
2.OBJETIVO GERAL	13
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
3. FUNDAMENTAÇÃO.....	14
3.1 Relação entre dislipidemia e obesidade	15
3.2 Fisiopatologia da dislipidemia e obesidade	16
3.3 Tratamento da dislipidemia e obesidade.....	20
3.4 Terapia nutricional na dislipidemia e obesidade	22
3.5 Extratos naturais e oefeito hipolipidêmico e antiobesidade	24
3.6 Própolis vermelha	25
4.MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 Obtenção da própolis vermelha e manteiga líquida	28
4.2 Extração e rendimento.....	28
4.3 Caracterização – Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	28
4.3.1 Própolis Vermelha	28
4.3.2 Manteiga líquida	29
4.4 Ensaio biológico.....	30
4.4.1 Aspectos Éticos.....	30
4.4.2 Delineamento experimental	30
4.4.3 Procedimentos de indução a dislipidemia	30
4.4.4 Fase de tratamento da dislipidemia com EHPV	31
4.4.5 Estatística	32
5. RESULTADOS	33
5.1 Rendimento e caracterização química do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha	34
5.2 Caracterização da manteiga líquida	35
5.3 Fase de indução de dislipidemia	35
5.4 Fase experimental de tratamento do estado dislipidêmico	37
5.5 Análise histomorfológica dos órgãos excisionados.....	39
5.5.1 Análise histomorfológica dos espécimes renais.....	39
5.5.2 Análise histomorfológica dos espécimes hepáticos.....	43
5.5.3 Análise histomorfológica dos espécimes intestinas (intestino grosso).....	45
6.DISSCUSSÃO	48
7. CONCLUSÕES.....	57

REFERÊNCIAS.....	58
ANEXO	68

RESUMO

As disfunções metabólicas decorrentes dos hábitos alimentares têm sido investigadas. Além disso, a dislipidemia e a obesidade podem estar associadas, pois ambas apresentam relação com alimentação e estilo de vida. Ao decorrer das décadas, é crescente a população acometida por esses distúrbios. Diante da complexidade que abrange os eventos fisiopatológicos da dislipidemia e obesidade, estratégias terapêuticas/ nutricionais que possam limitar o quadro dislipidêmico e paralelamente proporcionar a melhoria da saúde tem sido objetivo de estudos. Neste sentido, e considerando que há necessidade de novos tratamentos complementares para reverter esse quadro, os extratos vegetais mostram-se favoráveis ao metabolismo lipídico. Em particular, a própolis vermelha tem destaque entre os produtos naturais com potencial biológico, apresenta uso etnofarmacológico e um amplo potencial fitoquímico de valor funcional, há evidências que descrevem suas ações antioxidantes, anti-inflamatória e hipolipidêmica. O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos do tratamento para dislipidemia com extrato hidroalcoólico de própolis vermelha (EHPV) em ratos. Para a realização desse estudo os ratos *Wistar* machos foram submetidos à fase de indução a dislipidemia durante oito semanas. Os animais foram alocados em dois grupos, controle (CTR) e dieta hiperlipídica (DHL). O grupo CTR recebeu água destilada 1 mL/ 100g de peso por dia e o grupo DHL recebeu 1 mL/ 100 g de peso por dia de manteiga líquida, ambos receberam ração padrão. Em seguida, foi iniciada a fase de tratamento com duração de quatro semanas, na qual os animais foram alocados em três grupos: CTR, DHL-veículo e DHL-EHPV. Nestes grupos os tratamentos foram água destilada 1 mL/ 100 g, Tween 80 a 2% 0,1 mL/ 10 g e 10 mg/Kg de EHPV, respectivamente. O tratamento nas duas fases foi administrado por via oral (gavagem). O EHPV foi analisado por meio da cromatografia líquida de alta eficiência para a identificação dos compostos químicos daidzeína, formononetina e biochanina A. A manteiga líquida foi analisada da mesma forma e apresentou colesterol em sua composição. Os resultados da fase de indução mostraram que o grupo DHL-veículo apresentou ganho de massa corpórea em relação ao grupo CTR ($p < 0,05$), assim como os níveis séricos de colesterol total e triglicerídeos foram significativamente maiores no grupo DHL-veículo em relação ao grupo CTR ($p < 0,05$). Após a fase de tratamento, foi percebido que o uso do EHPV impediu o aumento do colesterol total do grupo DHL-EHPV em relação ao grupo DHL-veículo ($p < 0,001$). Contudo, não foi percebido o mesmo em relação aos níveis de triglicerídeos ($p > 0,5$). Posteriormente à eutanásia dos animais, foi analisada a massa ponderal do tecido adiposo abdominal, em relação ao grupo CTR e os grupos DHL-veículo e DHL-EHPV houve diferença estatística ($p < 0,001$), assim como entre os grupos DHL-veículo e DHL-EHPV. No que se refere à análise histomorfológica, foi percebido nos espécimes do fígado, rins e intestino grosso que a dieta hiperlipídica causou inflamação e o uso do EHPV amenizou o aspecto inflamatório nesses órgãos. Conclui-se que o modelo de indução a dislipidemia utilizando manteiga líquida foi eficiente e o uso do EHPV apresentou efeito hipolipidêmico em modelo murino.

Palavras-chave: própolis; dislipidemia; obesidade.

ABSTRACT

Metabolic dysfunctions due to eating habits have been investigated. In addition, dyslipidemia and obesity may be associated, since both are related to diet and lifestyle. Over the decades, the population affected by these disorders is increasing. In view of the complexity that encompasses the pathophysiological events of dyslipidemia and obesity, therapeutic / nutritional strategies that may limit the dyslipidemic condition and in parallel provide improved health has been the objective of studies. In this sense, and considering that there is a need for new complementary treatments to reverse this situation, plant extracts are favorable for lipid metabolism. In particular, red propolis stands out among natural products with biological potential, presents ethnopharmacological use and a broad phytochemical potential of functional value, there are evidences that describe its antioxidant, anti-inflammatory and hypolipidemic actions. The objective of this study was to evaluate the effects of treatment for dyslipidemia with hydroalcoholic extract of red propolis (EHPV) in rats. For this study the male Wistar rats were submitted to the induction phase of dyslipidemia for eight weeks. The animals were allocated in two groups, control (CTR) and hyperlipidic diet (DHL). The CTR group received distilled water 1 mL / 100g of weight per day and the DHL group received 1 mL / 100 g of weight per day of liquid butter, both received standard feed. Then the treatment phase was started with a duration of four weeks, in which the animals were allocated in three groups: CTR, DHL-vehicle and DHL-EHPV. In these groups treatments were 1 mL / 100 g distilled water, 2% Tween 80 0.1 mL / 10 g and 10 mg / kg EHPV, respectively. Treatment in the two phases was given orally (gavage). The EHPV was analyzed using high performance liquid chromatography to identify the chemical compounds daidzein, formononetin and biochanin A. The liquid butter was analyzed in the same way and presented cholesterol in its composition. The results of the induction phase showed that the DHL-vehicle group presented a body mass gain in relation to the CTR group ($p < 0.05$), as well as the serum levels of total cholesterol and triglycerides were significantly higher in the DHL-vehicle group in relation to the CTR group ($p < 0.05$). After the treatment phase, it was observed that the use of EHPV prevented the increase of the total cholesterol of the DHL-EHPV group in relation to the DHL-vehicle group ($p < 0.001$). However, the same was not noticed in relation to triglyceride levels ($p > 0.5$). After the euthanasia of the animals, the weight of the abdominal adipose tissue was analyzed, in relation to the CTR group and the DHL-vehicle and DHL-EHPV groups, there was statistical difference ($p < 0.001$), as well as between DHL vehicle and DHL -EHPV. Regarding the histomorphological analysis, it was observed in the liver, kidney and large intestine specimens that the hyperlipid diet caused inflammation and the use of EHPV softened the inflammatory aspect in these organs. It was concluded that the model of induction of dyslipidemia using liquid butter was efficient and the use of EHPV presented a hypolipidemic effect in a murine model.

Keywords: propolis; dyslipidemia; obesity.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A dislipidemia é uma condição clínica em decorrência da alteração do metabolismo lipídico que se caracteriza pela elevação dos níveis plasmáticos de colesterol total (CT), lipoproteína de baixa densidade (LDL) e triglicerídeos (TG), assim como pela redução das concentrações plasmáticas da lipoproteína de alta densidade (HDL). Tal alteração nos níveis séricos dos lipídeos representa fator de risco para o desenvolvimento de aterosclerose, o que pode ocasionar complicações como infarto agudo do miocárdio e acidente vascular cerebral (AVC) (ARQUIVOS BRASILEIROS DE CARDIOLOGIA, 2017; RASHID; GENEST, 2007; ROCHA *et al.*, 2014). No Brasil, 53,8% da população apresenta excesso de peso e 22,6% dislipidemia. Cabe ressaltar que Aracaju - SE é a capital brasileira que apresenta maior frequência de dislipidemia (28,7%) em relação às outras capitais do país (VIGITEL, 2016).

A relação entre a dislipidemia e o excesso de peso é descrita por Katulanda *et al.* (2018), no qual foi observado que o índice de massa corporal (IMC) estava associado ao aumento do LDL e diminuição do HDL. Entretanto, a etiologia das alterações dislipidêmicas e obesogênicas têm sido relatadas como multifatoriais, por isto, embora se relacionem em quadros clínicos, o surgimento dessas condições envolve aspectos genéticos, psicológicos, ambientais e fisiológicos (MONTEIRO *et al.*, 2016).

O estilo de vida e a comodidade para realização das atividades diárias refletem em menor demanda energética, na qual há maior consumo calórico proveniente da alimentação do que necessidade energética no metabolismo basal (WEBB; WADDEN, 2017). Além disso, a composição nutricional dos alimentos consumidos pode influenciar nos níveis séricos lipídicos (QUEIROZ *et al.*, 2015). Nesse sentido, quanto maior o teor de lipídeos na composição dos alimentos que compõem a dieta de uma dada população, maior será a oferta de ácidos graxos e, portanto, risco de desenvolvimento de condições dislipidêmicas e agravos associados (DEON *et al.*, 2015). Na região Nordeste do Brasil, o uso da manteiga líquida (ML) na culinária regional expressa a cultura e os hábitos alimentares dessa população, estudos prévios demonstram que a composição da manteiga líquida é constituída predominantemente por ácidos graxos saturados, portanto, torna-se uma fonte dietética acessível para o desenvolvimento da indução à dislipidemia, representando ainda os aspectos regionais (CLEMENTE *et al.*, 2009).

A maioria das complicações secundárias causadas por hiperlipidemia e obesidade está relacionada a altos níveis de geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), com consequente aumento do estresse oxidativo, e indução de resposta inflamatória difusa (TANGVARASITTICHAJ, 2015). Por esta razão, estudos experimentais objetivando controlar

os níveis lipídicos do sangue têm focado em reduzir o estresse oxidativo e a peroxidação lipídica causada por condições dislipidêmicas (TANKO *et al.*, 2017).

Estudos no campo da nutrição humana apoiam a evidência que os polifenóis são um dos grupos mais importantes de antioxidantes naturais encontrados na dieta, incluindo frutas, legumes, cereais, chás, óleos essenciais e bebidas derivadas. Os compostos fenólicos dietéticos podem melhorar a saúde humana, reduzir o risco do aparecimento de doenças degenerativas, doenças cardiovasculares e desordens metabólicas (TSAO, 2016). Perante a complexidade que abrange os eventos fisiopatológicos da dislipidemia, estratégias terapêuticas/ nutricionais que possam controlar os níveis lipídicos plasmáticos e ao mesmo tempo atuar na redução da massa corpórea, proporcionando a melhoria da saúde tem sido objetivo de estudos (SOUSA *et al.*, 2017; TANKO *et al.*, 2017; SAFAEIAN *et al.*, 2018). Assim, devido ao alto teor de substâncias anti-inflamatórias e antioxidantes, como compostos fenólicos e flavonóides, os produtos naturais são considerados fontes potenciais para a identificação de novos nutracêuticos / fitoterápicos a serem utilizados no tratamento da dislipidemia (EL-TANTAWY, TEMRAZ, 2018; FAMUREWA *et al.*, 2018).

A própolis vermelha brasileira é um material resinoso produzido por abelhas da espécie *Apis mellifera* a partir do exsudato da *Dalbergia echastophyllum* e serve como uma barreira natural para proteger as colmeias de parasitas invasores, bactérias e vírus (BANKOVA *et al.*, 2000). Os componentes químicos farmacologicamente ativos mais conhecidos na própolis vermelha são flavonóides, isoflavonoides e ácidos fenólicos, que são responsáveis por suas ações anti-inflamatórias (LIMA-CAVENDISH *et al.*, 2015) e antioxidantes (NASCIMENTO *et al.*, 2016), dentre outras.

Foi previamente relatado que o extrato etanólico de própolis vermelha brasileira é capaz de melhorar a diferenciação de adipócitos 3T3-L1 através da ativação de receptores ativados por proliferador de peroxissoma (PPAR γ), bem como é capaz de reverter os efeitos inibitórios do TNF- α na diferenciação de adipócitos e expressão de adiponectina, um hormônio protéico envolvido na regulação da degradação de ácidos graxos (LIO *et al.*, 2010).

Diante do exposto, há o ensejo para avaliar os efeitos do extrato da própolis vermelha sobre a obesidade e a dislipidemia. Além das propriedades funcionais benéficas à saúde, a própolis vermelha apresenta distribuição anual regular, o que torna favorável para utilização terapêutica. Aditivamente, a ampla aplicação desse extrato causa maior necessidade de produção na região do Nordeste, isto possibilitará ganhos econômicos para essa localidade.

2. OBJETIVO GERAL

- Avaliar os efeitos da administração oral do EHPV em ratos submetidos à suplementação dietética hiperlipídica

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter e caracterizar o EHPV.
- Induzir a dislipidemia nos animais experimentais (*Rattus norvegicus albinus*, linhagem Wistar);
- Avaliar o efeito da administração oral do EHPV sobre parâmetros bioquímicos e murinométricos em ratos submetidos a suplementação dietética hiperlipídica;
- Avaliar o efeito da administração oral do EHPV sobre as alterações histopatológicas do fígado, rins e o intestino grosso dos animais submetidos à suplementação dietética hiperlipídica.

3. FUNDAMENTAÇÃO

3. FUNDAMENTAÇÃO

3.1 Relação entre dislipidemia e obesidade

As doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) compõem o cenário das problemáticas na área da saúde em escala global. Esse conjunto de doenças tem causado a diminuição da qualidade de vida, limitações e incapacidade em adultos jovens. Além disso, há impactos econômicos no sistema de saúde para o tratamento das DCNT (WHO, 2016). Nesse contexto, a dislipidemia e a obesidade destacam-se pelo risco de co-morbidades associadas a estas condições clínicas, como doenças cardiovasculares (DCV) e acidente vascular cerebral (AVC) (MARIATH *et al.*, 2007).

A obesidade é definida como o acúmulo de gordura corpórea, resultando do excesso de peso, para classificar o indivíduo como obeso um dos parâmetros utilizados é o índice de massa corporal (IMC) maior ou igual a 30 Kg/m² (WHO, 2016). Entretanto, não é o excesso de peso, mas sim o excesso de gordura e a sua distribuição corporal que se relacionam com as comorbidades associadas à obesidade (SWEETING, 2007).

De forma genérica a obesidade se classifica em dois subtipos: obesidade andróide (abdominal, visceral ou central) e ginoide (glúteo-femoral); no entanto, a concentração de tecido adiposo na região abdominal/visceral representa o maior fator de risco para doenças cardiovasculares (DCV). Por isto, a avaliação da circunferência abdominal permite identificar a distribuição da adiposidade corporal, independentemente da estatura, e reflete a quantidade de massa gorda intra-abdominal. Embora o IMC apresente limitações, existe uma associação estreita entre o IMC > 30Kg/m² e o risco de desenvolvimento de DCV (VÁZQUEZ, 2016).

Pesquisas sugerem a utilização de equações de predição de gordura corpórea, partindo da premissa de que a localização da gordura central seria mais relevante do que o diagnóstico do grau de obesidade geral, para avaliação do risco de DCV (LESSER *et al.*, 2012). Sendo assim, o aumento dos indicadores de risco para a saúde, como a medida da circunferência abdominal acima da recomendação referida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) que estabelece como ponto de corte para risco cardiovascular aumentado medida igual ou superior a 94 cm em homens e 80 cm em mulheres (DIRETRIZES BRASILEIRAS DE OBESIDADE, 2016). Tal indicador poderá ser associado ao acúmulo da gordura visceral que pode influenciar no decréscimo da tolerância à glicose, dislipidemias, hipertensão arterial e síndrome metabólica (SLENTZ *et al.*, 2009; JAYALAKSHMI *et al.*, 2011; AYVAZ *et al.*, 2011).

A determinação do risco vascular em decorrência da obesidade requer avaliação dos parâmetros lipídicos. Os lipídios são indispensáveis ao funcionamento do organismo, pois atuam nos processos de regeneração, substituição e desenvolvimento celular. Porém em níveis séricos elevados podem se tornar um fator de risco para DCV. A dislipidemia é um distúrbio metabólico caracterizado pela elevação das taxas de triglicerídeos (TG), colesterol total (CT), o aumento do colesterol da lipoproteína de baixa densidade (LDL), sendo este o principal marcador desta condição clínica, seguido da redução da lipoproteína de colesterol de alta densidade (HDL) (FIDÈLE *et al.*, 2017).

Nos estudos desenvolvidos por Estadella *et al.* (2004) e Guerra *et al.* (2007), foi utilizado dieta hiperlipídica durante 08 semanas para induzir o aumento do ganho de massa corporal em roedores e conseqüentemente elevar os níveis séricos de CT e TG. Assim como, demonstrado por Barners *et al.* (2003) e Silva *et al.* (2010) o modelo de indução de obesidade e dislipidemia por meio da DHL, num período de 12 semanas, mostrou-se eficaz.

3.2 Fisiopatologia da dislipidemia e obesidade

A relação entre a dislipidemia e a obesidade tem sido descrita por estudiosos desta temática. Embora não representem causalidade direta entre si, há mecanismos fisiológicos que propõe a associação entre essas condições metabólicas, pois a formação do tecido adiposo expressa alterações endócrinas que podem alterar o metabolismo lipídico (FRANSSEN *et al.*, 2011; PAPP *et al.*, 2012; RAHIMLOU *et al.*, 2015).

O tecido adiposo branco (TA) é considerado um órgão endócrino, capaz de produzir diversas substâncias bioativas, denominadas de adipocinas. O TA possui funções metabólicas, hormonais e imunológicas e as células que constituem o TA, denominadas adipócitos, sintetizam e secretam diferentes proteínas da fase aguda e mediadores da inflamação, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), as interleucina 6, 10 e 8 (IL-6, IL-8 e IL-10), o inibidor do ativador do plasminogênio (PAI-1), o angiotensinogênio, a adiponectina, a resistina, a lipoproteína lipase e os ácidos graxos livres (KERSHAW, 2004).

Da mesma forma que, exercem influência em processos fisiológicos como o balanço energético, o metabolismo lipídico e glicídico, a atividade da insulina, a angiogênese e a remodelação vascular, a pressão arterial e a coagulação (KERSHAW, 2004). Cabe ressaltar que os adipócitos secretam leptina como produto do gene da obesidade, o que estabelece o tecido adiposo como um órgão endócrino que interage com o sistema nervoso central (LIN *et al.*, 2016).

O aumento da camada adiposa visceral, em particular a hipertrofia dos adipócitos, tem como efeito a desregulação metabólica destas células, o que se reflete na infiltração de

macrófagos e expressão de diversos marcadores inflamatórios, caracterizando a obesidade (PRADO *et al.*, 2009). Ilustrado na figura 1.

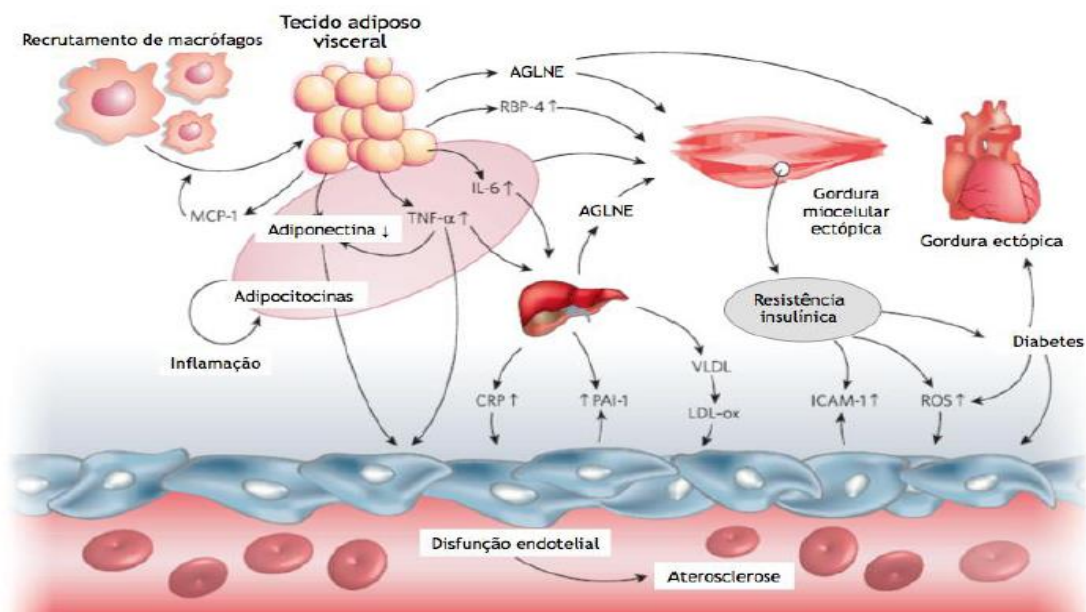


Figura 1. Relação entre obesidade e resistência insulínica devido aos mecanismos fisiológicos que o tecido adiposo visceral contribui. O desenvolvimento de resistência insulínica pelo efeito direto de citocinas (TNF- α , IL-6) e outras adipocinas (RBP-4), de redução da adiponectina e pela deposição de AGLNE em outros tecidos, em especial fígado e músculo esquelético. AGLNE: ácidos graxos livres não esterificados, RBP-4: proteína 4ligadora do retinol, IL-6: interleucina 6, TNF- α : fator de necrose tumoral alfa, MCP-1: proteína 1 quimiotática de macrófagos, CPR: proteína C reativa, PAI-1: inibidor 1 do ativador do plasminogênio, VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade, LDL-ox: lipoproteína de baixa densidade oxidada, ROS: espécies reativas de oxigênio, ICAM-1: molécula 1 de adesão intercelular. Adaptado de GAAL *et al.* (2006).

A hipóxia celular é o mecanismo proposto como o ponto inicial para a cascata inflamatória. A partir do aumento do TA há diminuição do fluxo sanguíneo na massa adipocitária, o que contribui para a hipóxia e posterior necrose coagulativa dos adipócitos hipertrofiados (TRAYHUM *et al.*, 2008). Outro mecanismo proposto é que o excesso de ácidos graxos depositados resultaria em disfunções do retículo endoplasmático e das mitocôndrias, gerando estresse oxidativo celular e consequente necrose de adipócitos. Neste sentido, cabe ressaltar a importância da proteína quimiotática para monócitos-1 (MCP-1), devido a maior produção mitocondrial de espécies reativas de oxigênio (EROs) em monócitos circulantes e o aumento da concentração sérica da LDL oxidada (LDL-ox), estimula a atividade migratória de macrófagos para o tecido adiposo (PANEE, 2012). Estas células imunocompetentes têm por finalidade realizar a fagocitose dos adipócitos necrosados (RASOULI; KERN, 2008).

Os macrófagos são metabolicamente ativos e a depender do fenótipo, representados pelos subtipos M1 e M2, têm o potencial de síntese de substâncias pró e anti-inflamatórias, respectivamente. Na obesidade os macrófagos tipo M1 aparecem em predominância e secretam mediadores pró-inflamatórios, como TNF- α e as IL-6 e IL-14 que mantêm a cascata inflamatória e são ativas no processo fisiopatológico da obesidade (SOUZA *et al.*, 2014).

O balanço energético consiste no controle da ingestão alimentar e do gasto energético e das interações entre nutrientes e diferentes hormônios neuronais (IBARS *et al.*, 2016). As adipocinas predominantes na obesidade são a leptina e a adiponectina. A leptina é secretada principalmente a partir do tecido adiposo branco, caracterizando-se como a principal molécula transmissora de informações ao sistema nervoso central, mais precisamente ao hipotálamo, sobre o teor de energia armazenada no tecido adiposo. Desta forma, esta molécula atua no controle da ingestão alimentar, apetite e saciedade, participando indiretamente da regulação do balanço energético. No entanto, na obesidade, há um paradoxo com relação ao elevado teor de leptina, pois nessa condição clínica não ocorre diminuição do apetite, o que parece refletir um estado de resistência a leptina nos indivíduos obesos (GODOY-MATOS *et al.*, 2014).

Além de exercer função na homeostase energética, a leptina desempenha atividades regulatórias em mecanismos fisiológicos associados à resposta imune. Ela atua principalmente estimulando a secreção de outras citocinas, como é o caso da IL-6 e do TNF- α , por meio da ativação direta de células imunes como os macrófagos e as células T pró-inflamatórias (GOMES *et al.*, 2010).

Outra adipocina relacionada ao quadro da obesidade é a adiponectina, cujos níveis séricos são diminuídos na obesidade visceral. Dentre as atividades biológicas desta citocina destacam-se a redução da expressão de TNF- α , diminuição da quimiotaxia para macrófagos, estimulação da diferenciação de macrófagos fenotipicamente tipo-M2, aumento da produção de óxido nítrico, estimulação da angiogênese e potencialização da sensibilidade à insulina. Por isto é considerada uma adipocina com propriedades anti-inflamatórias, anti-aterogênicas e anti-diabéticas. No entanto, a expressão deste hormônio é inibido em condições de hipóxia e estresse oxidativo tecido, bem como por atividade de TNF- α e IL-6, presentes em indivíduos obesos. Em decorrência desses fatores, o efeito anti-inflamatório da adiponectina na obesidade é suprimido (CARBONE *et al.*, 2012).

Os adipócitos e os macrófagos do TA expressam substâncias de sinalização parácrina que ocasionam a liberação de múltiplos mediadores pró-inflamatórios. Por sua vez, estes mediadores estimulam a liberação de outros marcadores inflamatórios, como a

proteína C reativa (PCR) metabolizada no fígado. A disfunção na produção de citocinas pró-inflamatórias constitui o processo inflamatório crônico na obesidade. Por consequência, estes mediadores sistêmicos são atuantes nas complicações metabólicas e cardiovasculares da obesidade, que incluem a resistência à insulina, a hipertensão arterial e estados pró-trombóticos (PIRES *et al.*, 2015).

A obesidade é definida por um desequilíbrio entre o consumo energético da alimentação e o gasto energético do indivíduo (AZMAN *et al.*, 2011; SLOBODA; VICKERS, 2011). É considerada uma condição bastante complexa, tratada como fator de risco para o desenvolvimento de diversos efeitos deletérios ao organismo como a formação excessiva de tecido adiposo, hiperglicemia, hipertensão, aumento dos níveis de colesterol total, LDL colesterol e triglicérides, doenças cardiovasculares, esteatose hepática, entre outras comorbidades associadas e fatores psicossociais (ANDERSEN *et al.*, 2010; WIT *et al.*, 2010; IYER *et al.*, 2012).

A associação entre o acúmulo do TA e o perfil lipídico é descrita por Vasques *et al.* (2007), nesse estudo foi observada a associação positiva entre os maiores níveis glicêmicos e de TG nos pacientes com excesso de peso e adiposidade central. Foi possível concluir que há associação entre o inadequado perfil metabólico e o excesso de peso e/ou adiposidade abdominal o que evidencia as complicações crônicas decorrentes do TA.

O colesterol é precursor dos grupos esteroides no organismo, como os hormônios sexuais, corticosteroides e ácidos biliares. Ademais, exerce papel estrutural nas membranas e na camada externa das lipoproteínas. O fígado e o intestino realizam a absorção e a síntese do colesterol ingerido na dieta, em geral todos os tecidos com células nucleadas são capazes de efetuar esta síntese, que ocorre no retículo endoplasmático e nos compartimentos citosólicos (CONTI *et al.*, 2015).

A síntese no organismo ocorre a partir das moléculas de acetil-CoA e formam o mevalonato por meio da reação reguladora importante da via, catalisada pela HMG-CoA-redutase. Posteriormente, uma unidade isoprenoide de cinco carbonos é sintetizada, e seis dessas unidades de condensam para formar o esqualeno. O esqualeno passa por ciclização e forma o esteróide parental, o lanosterol que após a remoção de três grupos metil e outras alterações, forma o colesterol (BOER *et al.*, 2018).

O controle da síntese do colesterol no fígado é regulada por fatores interno e pelo colesterol proveniente da dieta. Nos tecidos, a regulação para equilibrar o colesterol é mantida entre os fatores que aumentam o colesterol, como a captação por meio dos receptores de LDL e fatores que causam a degradação de colesterol como a síntese de

esteroides. Para alcançar esse equilíbrio, a atividade do receptor de LDL é modulada pelos níveis celulares de colesterol. No transporte reverso do colesterol, a HDL capta-se dos tecidos, e a LCAT esterifica-o e deposita-o no núcleo das partículas. O éster colesteril da HDL é captado pelo fígado, diretamente ou após transferência para a V-LDL, a IDL ou a LDL por meio da proteína de transferência de éster de colesteril. O excesso do colesterol é secretado pelo fígado na bile, sob a forma de colesterol ou sais biliares. Uma grande proporção de sais biliares é absorvida na circulação portal e retorna ao fígado como parte da circulação êntero-hepática (TALBOLT *et al.*, 2018).

Além disso, a capacidade oxidativa mitocondrial pode se encontrar reduzida em roedores expostos a DHL, o que favorece a elevação do acúmulo de gordura (POMPLUN *et al.*, 2007; VILARROYA *et al.*, 2009). Outro aspecto importante que também pode influenciar na formação da adiposidade é o tipo de gordura utilizada na composição da dieta. Segundo Buettner *et al.* (2006), as gorduras saturadas são capazes de promover de forma mais intensa a obesidade em relação à gordura poli-insaturada, sendo a primeira capaz de gerar aumento da lipogênese e depósito de microvesículas de gordura no fígado.

3.3 Tratamento da dislipidemia e obesidade

O tratamento da obesidade e dislipidemia envolve um trabalho multidisciplinar devido a sua complexidade. Os hábitos alimentares saudáveis e a prática de atividade física são tratamentos clínicos não medicamentosos, no entanto, o tratamento farmacológico pode ser adjuvante para minimizar a progressão da doença e suas complicações. O tratamento baseado somente no uso de fármacos para essa condição clínica é considerado pouco eficaz, fazendo-se necessário a mudança do estilo de vida, uma vez que, as orientações nutricionais podem auxiliar a diminuir o consumo de calorias na alimentação e os exercícios físicos a aumentar o gasto calórico. Cabe ressaltar que a escolha do tratamento é determinada de acordo com a gravidade do problema e as complicações associadas, como o desenvolvimento de diabetes e doenças cardiovasculares (DIRETRIZES BRASILEIRAS DE OBESIDADE, 2016; KHAM *et al.*, 2018).

A modificação do estilo de vida é a base para a perda de peso em longo prazo, no entanto, o alcance deste objetivo pode ser limitado devido ao eixo neuro-hormonal que se adapta para a manutenção do excesso de peso corporal. O uso de medicamentos pode ser necessário para auxiliar no metabolismo corpóreo, a farmacoterapia para a obesidade apresenta efeitos adversos e custo elevado (IGEL *et al.*, 2017).

As medicações antiobesidade não representam por si só, a solução para a obesidade. Do ponto de vista prático, os pacientes são inicialmente submetidos à dieta balanceada e exercício físico, ambos supervisionados por um período médio de três a seis meses. Faz-se necessário o uso medicamentoso quando há a incapacidade de perder peso apenas com a mudança do estilo de vida ou quando a manutenção do peso é comprometida pelo ganho recorrente (VARGAS *et al.*, 2018).

Os medicamentos hipolipidêmicos são utilizados associados ou não a remédios para controle do apetite e perda de peso. A hipercolesterolemia é uma condição onde a concentração plasmática de colesterol excede os valores considerados saudáveis. Concentrações elevadas de colesterol total e triglicerídeos refletem como fator de risco para o desenvolvimento da aterosclerose e conseqüentemente a Doença Arterial Coronariana, fator de propensão ao infarto agudo do miocárdio e o acidente vascular cerebral. A terapia medicamentosa inclui o uso de sinvastatina/ ezetimiba. A estatina inibe a enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoAredutase), bloqueando a síntese do colesterol hepático; enquanto a ezetimiba inibe a absorção intestinal do colesterol. Embora pareçam eficientes, em longo prazo essas medicações podem apresentar efeitos colaterais, como hepatotoxicidade e miopatia (FIORENZANO *et al.*, 2006).

A partir do ano de 2012, a *Food na DrugAdministration* (FDA) aprovou medicamentos para auxiliar no tratamento da obesidade. Atualmente, estes são indicados para adultos com IMC ≥ 30 Kg/m² que apresentem pelo menos uma comorbidade, como hipertensão ou diabetes tipo 2. Os fármacos agentes noradrenérgicos de ação central (fentermina, dietilpropiona, fendimetrazina e benzofetamina) são aprovados pela FDA para uso em curta duração, em torno de ≤ 12 semanas. A duração deste tipo de tratamento é limitada devido aos efeitos abusivos e eficácia transitória, ainda não elucidada na literatura. A ação central em curto prazo reduz o apetite e aumenta a ativação de receptores adrenérgicos e dopaminérgicos (YANOVSKI; YANOVSKI, 2014).

O tratamento medicamentoso de forma contínua acima de quatro anos, não é recomendado, pois há incertezas quanto à segurança deste uso. Em relação ao consumo de bebidas alcoólicas e gravidez, é indicado interromper o uso de medicações para perda de peso (KEITH, 2016). Diante das adversidades do uso farmacoterápico para tratar a obesidade, pesquisas na linha de extratos naturais despontam como potenciais adjuvantes ao tratamento.

A alimentação é fundamental para a melhoria da inflamação crônica associada à obesidade, neste sentido consumo de frutas e verduras *in natura* oferta benefícios à saúde. Além da oferta de nutrientes, os alimentos de origem vegetal apresentam compostos

bioativos com propriedades antioxidantes, anti-inflamatória e imunomodulatória (LIU *et al.*, 2012). Dentre os compostos bioativos, destacam-se os flavonóides, sugeridos na literatura como potenciais terapêuticos para regular os processos inflamatórios e o metabolismo lipídico (ASSINI *et al.*, 2013).

A associação entre os flavonoides e o metabolismo lipídico foi descrita por Revathy *et al.* (2018), foi observado nesse estudo que a hesperetina, que corresponde a classe química dos flavonoides, apresentou efeito hipolipidêmico em modelo experimental *in vivo*. O aumento da concentração de ácidos graxos também aumenta a oxidação de ácidos gordurosos, produzindo mais acetil-CoA e colesterol, que leva a dislipidemia. O efeito hipolipidêmico pode ser devido ao aumento da secreção de insulina que eventualmente leva a uma redução na síntese de colesterol e ácidos graxos. Além disso, o efeito de redução do colesterol da hesperetina pode ser relacionado à capacidade da hesperetina de se ligar aos ácidos biliares na região intestinal, aumentando assim a excreção de ácido biliar e diminuindo a absorção de colesterol pelo intestino.

3.4 Terapia nutricional na dislipidemia e obesidade

A dieta é um componente importante da abordagem terapêutica no tratamento da obesidade, podendo auxiliar no controle de diversas variáveis metabólicas. A elaboração do plano nutricional deve considerar aspectos como a ingestão calórica diária, a adequação do controle da massa corporal e a intensidade de exercícios físicos praticados, a consistência do conteúdo de carboidrato ingerido nas refeições, a qualidade nutricional dos alimentos e os horários das refeições (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2016).

Em decorrência das complicações causadas pela obesidade, torna-se indispensável buscar estratégias nutricionais que promovam a redução de peso. Para tanto, a restrição energética pode ser considerada uma estratégia caracterizada pela redução na ingestão energética de 20-40% do consumo habitual. Tal objetivo pode ser atingido por meio da diminuição do consumo de alimentos fontes de carboidratos refinados, batatas, pão branco, arroz branco, doces e bebidas adoçadas, em contrapartida o aumento da ingestão de legumes e frutas pode melhorar a qualidade nutricional da alimentação. Outra estratégia benéfica para redução do peso corporal é o aumento da frequência das refeições (6 vezes ao dia), devido ao aumento da termogênese pós-prandial, ou seja, o aumento da produção de calor (até 8 h) após o consumo de uma refeição (ARCIERO *et al.*, 2013).

O consumo calórico diário deve ser baseado no aporte balanceado de macro e micronutrientes. Dentre os macronutrientes estão os carboidratos, as proteínas e os lipídeos, que exercem funções fisiológicas diferentes entre si. Os carboidratos influenciam sobre a glicemia, devido a sua transformação em glicose no processo digestivo que ocorre

no trato gastrointestinal. Estes são classificados em simples (mono e dissacarídeos) e complexos (polissacarídeos), bem como de acordo com o índice glicêmico (IG) e seu conteúdo de fibras, que caracterizam o carboidrato não digerível. O IG é uma medida da alteração do carboidrato sobre a glicemia, avaliada pelo aumento da glicemia após a ingestão de 50g do carboidrato em comparação com a mesma quantidade de um carboidrato em um alimento referência, em geral o pão ou a própria glicose. Valores abaixo de 55 são considerados baixos e acima de 70, elevados (FAO/WHO,1997).

Estudos relatam que as dietas hiperlipídicas são um dos principais fatores para desenvolver a obesidade, uma vez que, essas dietas levam ao excesso de gordura corporal devido a maior densidade energética e maior capacidade de estoque no organismo (POPPIT *et al.*, 2002). O tipo de lipídeo ingerido na dieta também pode influenciar no acúmulo de adiposidade, visto que algumas pesquisas mostram significativa correlação entre percentual de gordura corporal e percentual de gordura saturada e monoinsaturada consumida na dieta (PEREIRA *et al.*, 2003). O teor de gordura da alimentação deve ser mantido entre 25-35% das calorias totais. São propostas adequações nesse consumo de gorduras de acordo com o risco cardiovascular acentuado, são propostas (conforme estado nutricional do indivíduo) as seguintes recomendações: Ácidos graxos saturados - <7% das calorias totais; Ácidos graxos poli-insaturados - até 10% das calorias totais; Ácidos graxos monoinsaturados - até 20% das calorias totais e colesterol - < 200 mg/dia(FALUDDI *et al.*, 2017).

As dietas com alto IG são de rápida digestão, absorção e conversão em glicose, por isto esses processos geram flutuações de insulina e glicemia no organismo, que resulta na ausência da saciedade, sensação constante de fome e descontrole no consumo calórico. Neste quadro há o aumento da ingestão alimentar e conseqüentemente o aumento da lipogênese. Por outro lado, as dietas de baixo IG promovem uma liberação de insulina e glicose de forma gradual na corrente sanguínea e esta condição proporciona o aumento da oxidação da gordura que reduz a lipogênese e assim aumenta a saciedade, reduz a ingestão de alimentos (SILVA *et al.*, 2015).

Estudos anteriores relatam a perda de peso associada à melhora do perfil lipídico (diminuição dos níveis séricos de colesterol-LDL e triglicerídeos), assim como a pressão arterial sistólica e diastólica, restabelecimento da sensibilidade à insulina e adequação da glicemia de jejum. Além de que, há atenuação de marcadores inflamatórios, como IL-6, leptina e aumento de adiponectina (FONTANA, 2008; SWINBURN *et al.*, 2004). A perda de peso em torno de 5% a 10% do peso corporal está associada à redução do câncer de colo (PARKER; FOLSOM, 2003) e a uma redução de 15% na mortalidade por causas diversas (KRITCHEVSKY *et al.*, 2015).

Além da avaliação quantitativa do aspecto calórico da dieta, há um ramo da ciência da Nutrição que estuda a ação dos alimentos de acordo com a capacidade de benefícios pela alimentação que reduzam os riscos de doenças. São nomeados de alimentos funcionais aqueles que exercem ação metabólica ou fisiológica segura para o organismo (BALDISSERA *et al.*, 2011).

3.5 Extratos naturais e o efeito hipolipidêmico e antiobesidade

Os compostos fenólicos são potenciais agentes contra a obesidade devido ao seu potencial de redução dos hidratos de carbono, absorção e oxidação de gorduras, atividade anti-inflamatória e ação termogênica (TABERNERO *et al.*, 2014). Outrossim, atuam como reguladores no balanceamento energético, neuromoduladores e consumo alimentar (PANICKAR, 2013).

A absorção dos compostos fenólicos como resveratrol, daidzeína e genisteína, ocorre no intestino grosso e atinge o plasma, em torno de 10% do total ingerido via alimentar é absorvido. No entanto, são hidrolisados no intestino delgado pelo transporte das glucosidases, mais precisamente beta-glucosidases que convertem em os compostos fenólicos em agliconas para ser absorvido. Por isto, interagem com a microbiota intestinal, gera a produção de metabólitos bioativos por meio de clivagem do anel, redução, descarboxilação, desmetilação e desidroxilação, que pode variar a depender dos microorganismos do trato gastrointestinal (CHIOU *et al.*, 2014).

Em estudo *in vivo*, a fibra dietética proveniente do *Hibiscuss abdariffa* e *Agave fructans* foram administrados na alimentação de animais submetidos a uma dieta com alto teor de gordura. Os efeitos de cada extrato foram avaliados de forma isolada e em combinação. Foi percebido que a suplementação de *Hibiscuss abdariffa* foi associada a uma redução do peso corporal, tecido adiposo, colesterol total do plasma e glicemia, reduziu as citocinas pró-inflamatórias em tecido adiposo e IL-6 aumentado em tecido adiposo marrom. Estes efeitos foram mantidos quando *Hibiscuss abdariffa* foi associada com *Agave fructans* e foram independentes da redução do apetite (MOYANO *et al.*, 2016).

No mesmo sentido, o estudo desenvolvido por Ramírez *et al.* (2017), avaliou os efeitos anti-obesidade do chá das folhas de *Mangifera indica L.* Por apresentar teor elevado de compostos fenólicos, foi analisado a ação do chá em ratos com obesidade induzida e foi percebido que houve efeito positivo sobre a massa gorda, melhora das condições metabólicas e o tecido adiposo visceral apresentou redução no tamanho dos adipócitos. O mecanismo envolvido para regulação positiva foi a ativação de PPAR γ . E assim, afirma-se o potencial para possíveis aplicações clínicas no tratamento da obesidade e doenças metabólicas associadas.

A condição clínica da obesidade oferece risco para o desenvolvimento de doenças como diabetes tipo 2 e hiperlipidemia. A pesquisa de Azofeifa *et al.*, 2016, investigou a ação do extrato de amora em ratos com diabetes e hiperlipidemia induzidas. Dentre os constituintes químicos apresentam-se os polifenóis: antocianinas (cianidina-3-glucósido e cianidina-3-malonil glucósido) e os elagitaninos (lambertianina C e sanguina H-6). Tais compostos estão associados a diversos benefícios para a saúde, diminui o risco de doenças cardiovasculares, câncer, diabetes, processos inflamatórios e doenças neurodegenerativas (HE;GIUSTI,2010; KAUME *et al.*, 2012). Há influência positiva da ação antioxidante das antocianinas e elagitaninos diante do desequilíbrio metabólico em função do estresse oxidativo em estados patológicos (FINKEL, 2011).

3.6 Própolis vermelha

A própolis é fabricada pelas abelhas de forma natural através das misturas de suas próprias ceras e excreções salivares que dão origem a essa substância resinosa. A própolis retirada de regiões distintas do Brasil tem propriedades químicas e colorações diferentes, que dependem da flora na localidade de coleta. Um tipo de própolis brasileira é usualmente conhecida como “própolis vermelha” e as principais características químicas desta em extratos alcoólicos são flavonóides: pinocembrina, formononetina e isoliquiritigenina. Há relação entre a própolis vermelha e efeitos antioxidantes, anti-inflamatório e antitumoral (PINHEIRO *et al.*, 2014).

A própolis vermelha destaca-se dentre as variedades de própolis brasileiras devido a sua composição química. De acordo com Mayworm *et al.* (2014), tal variedade apresenta o maior teor de proantocianidinas em relação as própolis verde, marrom e castanha. As antocianinas, cuja nomenclatura é derivada do grego *antho*, flor, *kyannus*, azul, são pigmentos encontrados na seiva e a cor é determinada pelo pH do tecido vegetal, pois o azul de determinadas flores e o vermelho das rosas podem ser pelo mesmo glicosídeo, no entanto em pH diferente. São encontradas em diversas famílias de plantas cultivadas como *Vitaceae* (uva), *Rosaceae* (cereja, ameixa, framboesa, morango, amora, maçã, pêssego, etc) (LIMA *et al.*, 2002).

É sabível que as características químicas de todas as própolis brasileiras variam de acordo com a localização geográfica, pois é vasta a biodiversidade da flora existente no Brasil. A própolis vermelha é proveniente do litoral da região Nordeste, derivada das árvores *Dalbergia ecastophyllum*, popularmente chamada de “rabo-de-bugio”. A presença de isoflavonoides é amplamente relatada na literatura, assim como os taninos (DAUGSCH *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2008).

Os taninos são polifenóis que se associam a proteínas e formam complexos estáveis. A estes compostos são atribuídas propriedades antioxidantes, anti-inflamatória e antimicrobiana. Estão presentes na alimentação e são considerados constituintes funcionais, embora possuam papel antinutricional, por precipitarem proteínas e reduzir a digestão (WEI *et al.*, 2011; HOSTE *et al.*, 2012).

No estudo desenvolvido por Machado *et al.*, 2016, foi investigado o teor de compostos fenólicos e flavonoides presentes na própolis vermelha, verde e marrom, as amostras foram extraídas em supercrítico e em etanol. Assim como, avaliaram a atividade antioxidante destas e foi concluído que o extrato etanólico de própolis vermelha proveniente de Sergipe e Alagoas apresentou o maior teor de compostos fenólicos, flavonoides e potencial antioxidante em relação às outras amostras que foram investigadas.

Além disso, estudos relatam os efeitos anti-inflamatórios dos extratos de própolis vermelha. Foi observado que o extrato etanólico reduziu a migração de neutrófilos durante a inflamação por meio dos mecanismos que envolvem a inibição da liberação de TNF- α , IL-1 β , e das alfa-quimiocinas CXCL1/KC e CXCL2/MIP-2 (BUENO-SILVA *et al.*, 2016).

O estudo *in vitro* desenvolvido por LIO *et al.*, 2010 investigou os efeitos do extrato etanólico da própolis vermelha (EERP) na adipogênese e características anti-obesidade. Os resultados demonstraram que o EERP induz a diferenciação adipogênica que é acompanhada pelo aumento da expressão de fatores de transcrição e genes específicos de adipócitos envolvidos no acúmulo de lipídios e sensibilidade à insulina. Este também aumentou a expressão de PPAR γ (proliferadores de peroxissoma), das adiponectinas e do Transportador de glicose sensível à insulina tipo 4 (Glut4), assim como reverteu os efeitos inibitórios do TNF- α . Por isto, o EERP apresentou indícios potenciais para o tratamento da obesidade.

A ação da própolis brasileira na dislipidemia e diabetes mellitus tipo 2 foi avaliada em ratos machos com obesidade induzida. Os animais foram tratados durante 21 dias com extrato aquoso de própolis brasileira, observou-se que a mesma tem efeito benéfico, pois aumenta os níveis tissulares de PPAR γ , restaura os níveis séricos de adiponectina, melhora a sensibilidade à insulina e atenua o nível elevado de glicose (ELISSA *et al.*, 2015). No entanto, a própolis vermelha ainda não foi avaliada em modelo animal para a finalidade do tratamento dislipidêmico e obesogênico, portanto para o desenvolvimento dessa pesquisa foram seguidas as etapas descritas no item 4.

4.MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção da própolis vermelha e manteiga líquida

A própolis vermelha foi adquirida no município de Brejo Grande, em Sergipe. A amostra foi triturada em moinho de facas e sua granulometria classificada de 8-32mesh. Posteriormente, foi armazenada em recipiente refrigerado e sem contato com a luz.

A manteiga líquida (ML) que foi utilizada no procedimento de indução da obesidade e dislipidemia foi adquirida no Mercado Municipal de Aracaju, comercializada por uma das lojas especializadas em laticínios provenientes da agricultura familiar do Município de Glória (SE).

4.2 Extração e rendimento

A amostra bruta de (14 g) de própolis vermelha foi mantida durante 1 h em bequer contendo 175 mL de álcool a 70%. Após este período, a solução foi submetida a banho de ultrassom durante 1 h. O extrato obtido foi filtrado e o solvente eliminado por evaporação em estufa a 50°C durante sete dias, obtendo-se o extrato seco. O rendimento da extração foi calculado através da relação entre massa do EHPV obtido das placas de petri em relação à massa bruta de própolis vermelha utilizada (100%). O EHPV foi mantido em frasco âmbar sob refrigeração até o momento do uso (SILVA *et al.*, 2015).

4.3 Caracterização – Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

4.3.1 Própolis Vermelha

4.3.1.2 Preparo da amostra

O extrato de própolis vermelha (50 mg) foi dissolvido em 50 mL de metanol: água ultrapura (50:50 v/v) (1 mg/mL). A amostra foi submetida à banho de ultrassom durante 60 minutos, para a completa solubilização do extrato no solvente e para a retirada de bolhas da solução. Em seguida, a amostra foi filtrada em filtro de membrana de 0,45 µm analisada por CLAE.

4.3.1.3 Condições cromatográficas

As análises por CLAE foram realizadas em um cromatógrafo líquido Shimadzu®, equipado com um degaseificador DGU-20A3, duas bombas LC-20AD, um injetor automático SIL-20A HT, um forno CTO-20A, um detector de arranjo de diodos SPDM20Avp, acoplados a um sistema controlador CBM-20A. As análises foram determinadas em uma coluna analítica C₁₈ de fase reversa Phenomenex Luna de 150 x 4,6 mm de diâmetro (5 µm tamanho de partícula). O fluxo da fase móvel foi de 1 mL/min e o volume de injeção da

amostra foi de 20 µL. Os solventes utilizados na fase móvel foram: (B) metanol e (A) ácido acético (1%) em água ultrapura (v/v). A fase móvel foi filtrada e submetida à banho de ultrassom por 30 minutos antes das análises. O sistema gradiente de eluição começou com 40% B durante 10 minutos; 45 – 50% B durante 10 – 15 minutos; 50 – 55% B durante 15 – 20 minutos; 55% B durante 20 – 35 minutos; 55 – 100% B durante 35 – 50 minutos; 100 – 40% B durante 50 – 60 minutos; retornando as condições iniciais e finalizando a análise. O comprimento de onda para detecção dos compostos foi de 280 nm e a temperatura do forno foi de 25 °C. Os compostos foram identificados através da co-injeção de padrões (substâncias de referência), baseando-se no tempo de retenção e espectro ultravioleta (UV). Para as análises quantitativas, curvas de calibração de cada padrão foram preparadas em 5 diferentes concentrações: 2, 4, 6, 8 e 10 µg/mL. As análises foram realizadas em triplicata (n= 3).

4.3.2 Manteiga líquida

A quantificação do teor de colesterol na amostra de manteiga líquida foi realizada utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) segundo metodologia adaptada do trabalho de Saldanha *et al.* (2004). A um volume de 5,7 mL da amostra foram acrescentados 8 mL de KOH 50% e 12 mL de álcool etílico. Esse material foi homogeneizado e aquecido a 60° C sob agitação constante por 10 minutos. Após este período, 10 mL de água destilada foram adicionadas e a amostra foi resfriada. O material foi então submetido a processo de extração utilizando 15 mL de hexano com posterior coleta da fração hexânica. Esse procedimento foi repetido por três vezes. Subseqüentemente, a fração hexânica foi submetida à secagem, à lavagem com diclorometano e secagem novamente. A amostra remanescente apresentou peso de 0,7491g, cuja massa foi dissolvida em um balão de 1 mL em uma solução de acetonitrila e iso-propanol (1:1).

A dosagem de colesterol foi realizada por CLAE utilizando o cromatógrafo Pro Star (Varian), detector DAD (detector por arraste de diodos) e software (Programa Star Integrator Varian versão 4.5.) para o processamento dos dados. A coluna analítica utilizada foi a C18 (150 x 4,6mm x5µ) (Gemini, Phenomenex), mantida a 40 °C em forno com temperatura controlada. A amostra derivatizada(foi injetada no equipamento. A fase-móvel utilizada com sistema de bombeamento isocrático, composta de 90 % de acetonitrila e 10 % de isopropanol em fluxo de 1,5mL por minuto, sendo o tempo de análise de 15 minutos. Os cromatogramas foram processados com o comprimento de onda de 210nm.

4.4 Ensaio biológico

4.4.1 Aspectos Éticos

O presente projeto de pesquisa obedeceu às normas do CONCEA (Conselho Nacional de Experimentação Animal) e foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Tiradentes sobre o parecer consubstanciado nº 010117R(Anexo1).

4.4.2 Delineamento experimental

Foram utilizados 21 ratos machos da linhagem Wistar, provenientes do Biotério da Universidade Tiradentes (UNIT- SE). Os animais foram mantidos em condições padronizadas, com ciclo claro-escuro de 12 h, tratados com ração balanceada (Nuvilab[®]) e água *ad libitum*, com temperatura de 22± 2°C e umidade relativa de 70±5%. A ração padrão Nuvilab[®] é composta por: 19% de proteína, 56% de carboidrato, 3,5% lipídeos, 4,5% de celulose, 5% de vitaminas e minerais totalizando 17,03 kj/g.

4.4.3 Procedimentos de indução a dislipidemia

Os 21 animais foram alocados em dois grupos: controle (CTR) n=7 e dieta hiperlipídica (DHL) n=14, ambos foram alimentados com ração padrão Nuvilab[®]. O grupo DHL recebeu administração de ML (1 mL/100g do peso corporal), via oral (v.o; gavagem), com o objetivo de suplementar a dieta padrão e aumentar o teor lipídico. Esta dieta hiperlipídica foi administrada a partir do desmame sendo mantida por um período de oito semanas. Os sete animais do grupo CTR receberam água destilada durante o período de indução, para simular as mesmas condições de estresse do procedimento de gavagem, conforme está expresso no quadro 1.

Quadro 1. Formação dos grupos experimentais de acordo com a indução a obesidade e hiperlipidemia.

Grupos	Tratamento por (v.o)	Tempo
CTR (n= 7)	Água destilada 1 mL/ 100g do peso	08 semanas
DHL (n=14)	Manteiga líquida 1 mL/100g do peso	08 semanas

Ao decorrer da fase de indução foram realizadas coletas sanguíneas por meio de punção intracardíaca (volume de sangue coletado: 1 ml), posteriormente o material foi

centrifugado a 3000 rpm por 08 minutos, para a separação do soro. As dosagens séricas de TG e CT foram realizadas utilizando-se kits comerciais da marca Labtest[®], automatizados em equipamento Bioplus no Laboratório Central de Biomedicina da Universidade Tiradentes. As coletas ocorreram no início da fase de indução (semana zero) e ao final (semana oito)(PASSOS, 2010).

Para avaliar a massa corpórea dos todos os animais os grupos foram submetidos à mensuração da massa corpórea ao início de cada semana sempre no mesmo período da manhã. Foi utilizada uma balança digital (Marte[®], modelo AS2000C). Este procedimento foi efetuado a partir da semana zero até o término do experimento, a fim de investigar a existência de possíveis correlações entre variações na massa corpórea dos animais e a ingestão dietética.

O índice de Lee consiste na divisão da raiz cúbica do peso em gramas pelo comprimento nasoanal em milímetros e multiplicado por 1000. O índice de Lee e a massa gorda têm correlação. Ele pode ser usado como forma acurada e rápida de medir obesidade em experimento submetido a um método de ganho de peso. Torna-se necessária associação de um índice com outros dados antropométricos, como o aumento do TA (MALAFAIA *et al.*, 2013).

4.4.4 Fase de tratamento da dislipidemia com EHPV

De acordo com a metodologia de IBARS *et al.*, 2016, foi realizada em 28 dias, a partir do início dessa fase de tratamento foram alocados os grupos (n=7) de acordo com o tratamento, o grupo controle (CTR) recebeu 1mL de água/dia, o grupo DHL-Veículo que recebeu tween 80 a 2% 0,1 mL/ 10g / dia, o grupo EHPV10 recebeu 10 mg/Kg/dia, (BARBOSA *et al.*, 2017;CAVANDESHI *et al.*, 2015). Aditivamente, as doses de EHPV seguras para evitar toxicidade devem ser mantidas até 100 mg/kg (SILVA *et al.*, 2015). O quadro 2 apresenta a distribuição dos grupos durante a fase de tratamento.

Quadro 2. Formação dos grupos de tratamento.

Grupos de animais	Tratamento diário por (v.o)
CTR (n= 7)	3 mL de água destilada
DHL-Veículo(n= 7)	Tween 80 a 2% 0,1mL/ 10g
DHL-EHPV (n= 7)	10 mg/Kg de EHPV

Nesta fase de tratamento a avaliação da massa corpórea e a coleta sanguínea foram executadas conforme descrito no item 4.4.3.

A eutanásia dos animais ocorreu após os 28 dias de tratamento, foram coletadas amostras sanguíneas. Os animais foram mantidos em jejum durante a noite (12 horas) e, em seguida, submetidos ao procedimento de eutanásia por anóxia em câmaras de dióxido de carbono (modelo CGSCO2G, Marca Beira-Mae) durante 15 minutos. Todos os animais foram eutanasiados no mesmo período do dia, seguindo o mesmo período de jejum, foi realizada a remoção do fígado, rins e tecido adiposo, coletados para posterior análise. Para obter os espécimes, foram acondicionadas em frasco contendo formol a 10% (pH 7,4) por um período mínimo de 24 horas, para fixação. Em seguida o material foi encaminhado para processamento histológico e posterior avaliação das características morfológicas dos tecidos (KOIA- MIYATA *et al.*, 2009; SAMOUT *et al.*, 2016; IBARS *et al.*, 2016).

4.4.5 Estatística

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade (Shapiro-Wilk) e à homocedasticidade (Bartlett). Os dados com distribuição gaussiana foram expressos como média \pm erro padrão da média, e analisados usando o teste t de Student pareado (comparações entre duas medidas do mesmo grupo realizadas em dois tempos diferentes) e não pareado (comparações entre dois grupos) e ANOVA de uma via (comparações entre três grupos) seguido do teste *post-hoc* de Tukey para comparações em pares quando houve uma diferença global significativa entre os grupos. Os dados com distribuição não gaussiana foram expressos como mediana e intervalo interquartil e analisados pelo teste de Wilcoxon (comparações entre duas medidas do mesmo grupo realizadas em dois tempos diferentes) e Mann-Whitney (comparações entre dois grupos), assim como pelo teste de Kruskal-Wallis (comparações entre três grupos), seguido do teste *post-hoc* de Dunn. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* GraphPadPrism 5.0 (Software, Inc., LaJolla, CA, EUA) e os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Rendimento e caracterização química do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha

Neste estudo o rendimento da amostra de própolis vermelha foi de 17,46% m/v. O EHPV foi analisado por CLAE no comprimento de onda de 280 nm. No extrato foram identificados e quantificados três compostos Daidzeína, Formononetina e Biochanina A (Figura 2). Foram identificados e eluídos nos tempos de retenção de 12, 24 e 29 minutos, respectivamente (Figura 2). A concentração da quantificação dos compostos identificados estão descritos na tabela 1.

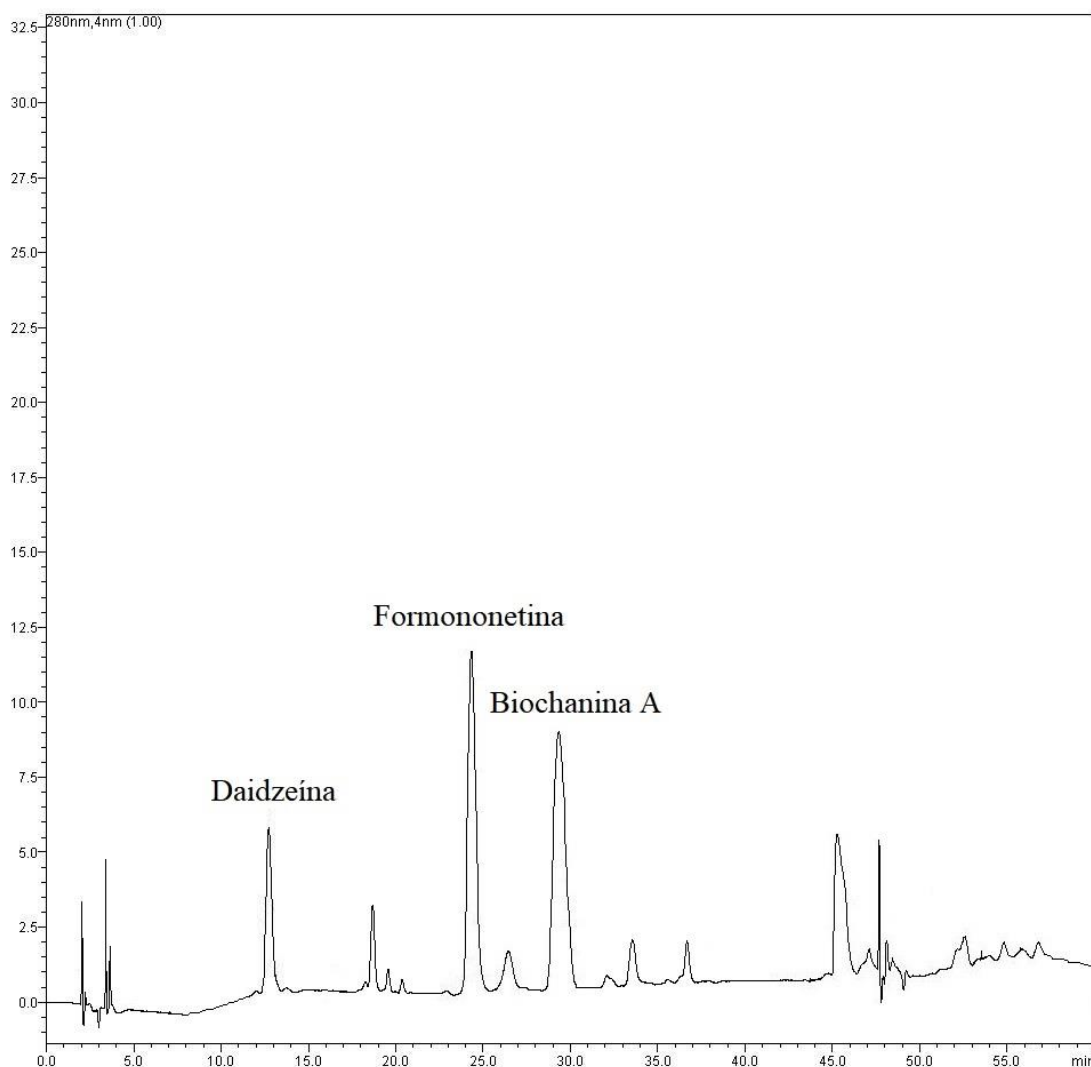


Figura 2. Cromatograma do EHPV (CLAE: 280 nm). Daidzeína: 12 minutos; Formononetina: 24 minutos e Biochanina A: 29 minutos.

	Concentração (mg/g)	Média ± DP (n = 3)
Daidzeína	4,36	4,16 ± 0,22
	3,92	
	4,20	
Formononetina	9,11	9,21 ± 0,10
	9,33	
	9,20	
Biochanina A	7,02	7,08 ± 0,09
	7,03	
	7,18	

Tabela 1. Concentração (mg/g) dos compostos identificados no EHPV.

5.2 Caracterização da manteiga líquida

A amostra remanescente de manteiga líquida que foi submetida à CLAE para determinar o teor de colesterol, (figura 2) apresentou uma média de colesterol de 309,0 mg/L, esse resultado foi expresso em percentual 4,12%.

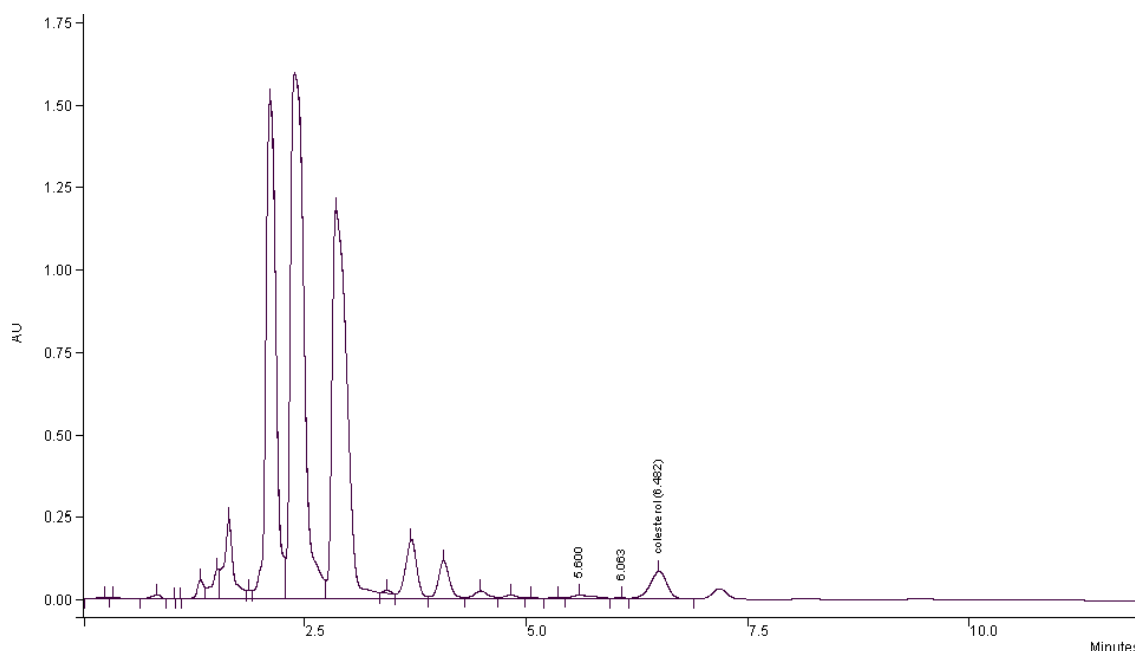


Figura 3. Cromatograma de manteiga líquida com a quantificação de colesterol contido na amostra.

5.3 Fase de indução de dislipidemia

Conforme demonstrado na Figura 4 A), ao final de 8 semanas, os animais do grupo DHL tiveram um ganho de peso corporal relativo ($34,3 \pm 1,31\%$) significativamente maiores

que os pertencentes ao grupo CTR ($28,9 \pm 0,79\%$) ($p < 0,05$). Além disso, observou-se um aumento significativo InL em CTR ($p < 0,01$) e DHL ($p < 0,001$) ao longo das oito semanas (Fig. 4 B), no final da fase de indução, o InL foi significativamente maior em DHL ($455,03 \pm 8,91$) do que em CTR ($388,32 \pm 16,42$) ($p < 0,01$, Fig.4C).

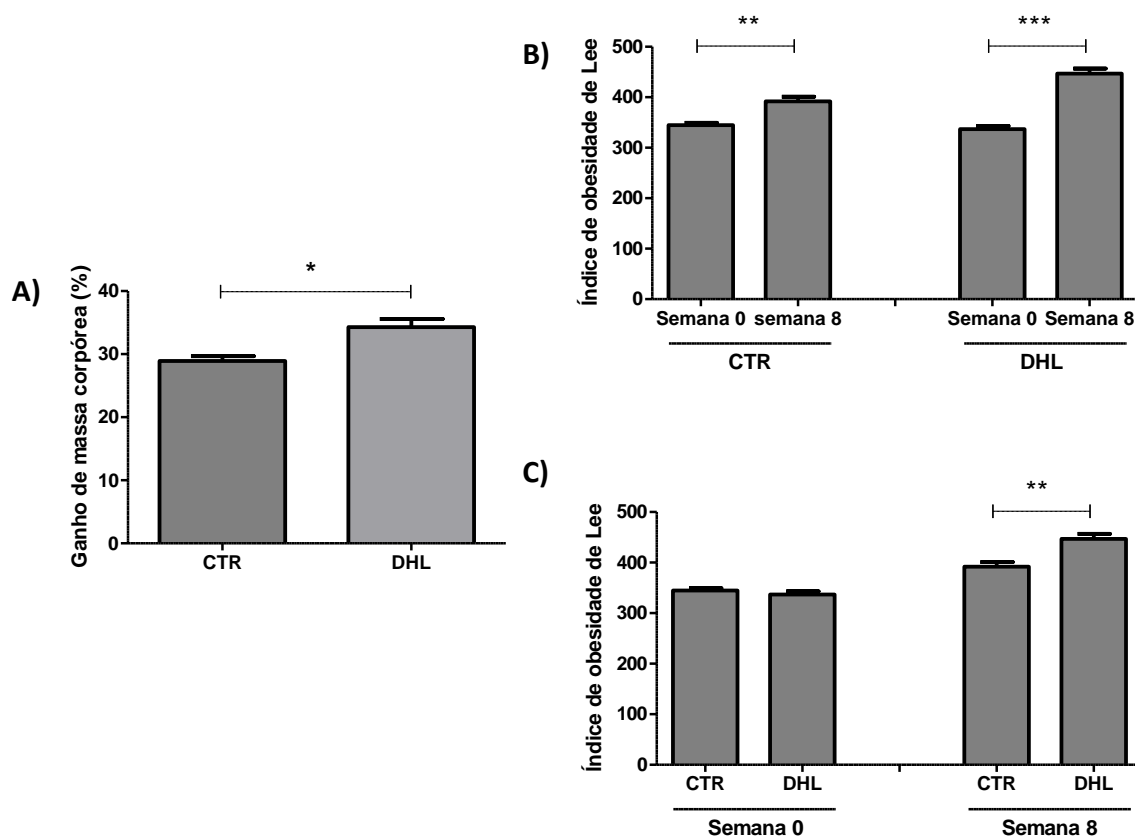


Figura 4. A) Ganho de massa corporal dos animais alimentados apenas com a dieta padrão (CTR) e aqueles que receberam suplementação dietética hiperlídica (DHL) (teste T de Student). B) Avaliação do InL nos grupos CTR e DHL no início (semana 0) e no final (semana 8) (teste T de Student). C) Comparação do InL entre os dois grupos no início e no final da fase de indução experimental (teste T de Student). As diferenças significativas entre os grupos foram expressas como: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

A Figura 5 mostra a avaliação dos níveis séricos de CT e TG nos animais dos grupos CTR e DHL ao longo e no final da fase de indução. Os níveis séricos de CT aumentaram da semana zero ($50,6 \pm 1,6$ mg / dL) para a semana oito ($59,7 \pm 1,1$ md / dL) em DHL ($p < 0,001$), enquanto que os níveis séricos de triglicérides (TG) aumentaram de $30,4 \pm 1,3$ para $36,8,7 \pm 1,2$ mg / dL ($p < 0,05$). Por outro lado, não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) no CTR nas oito semanas, tanto no CT (de $54,8 \pm 1,8$ a $53,8 \pm 0,93$ mg/dL) como na TG ($31,9 \pm 0,9$ a $29,7 \pm 1,5$ mg / dL). Além disso, no final da fase de indução, CT e TG obtidos em DHL foram significativamente maiores do que em CTR ($p < 0,001$). A análise final desses dados é indicativa de que um estado dislipidêmico foi alcançado no grupo DHL.

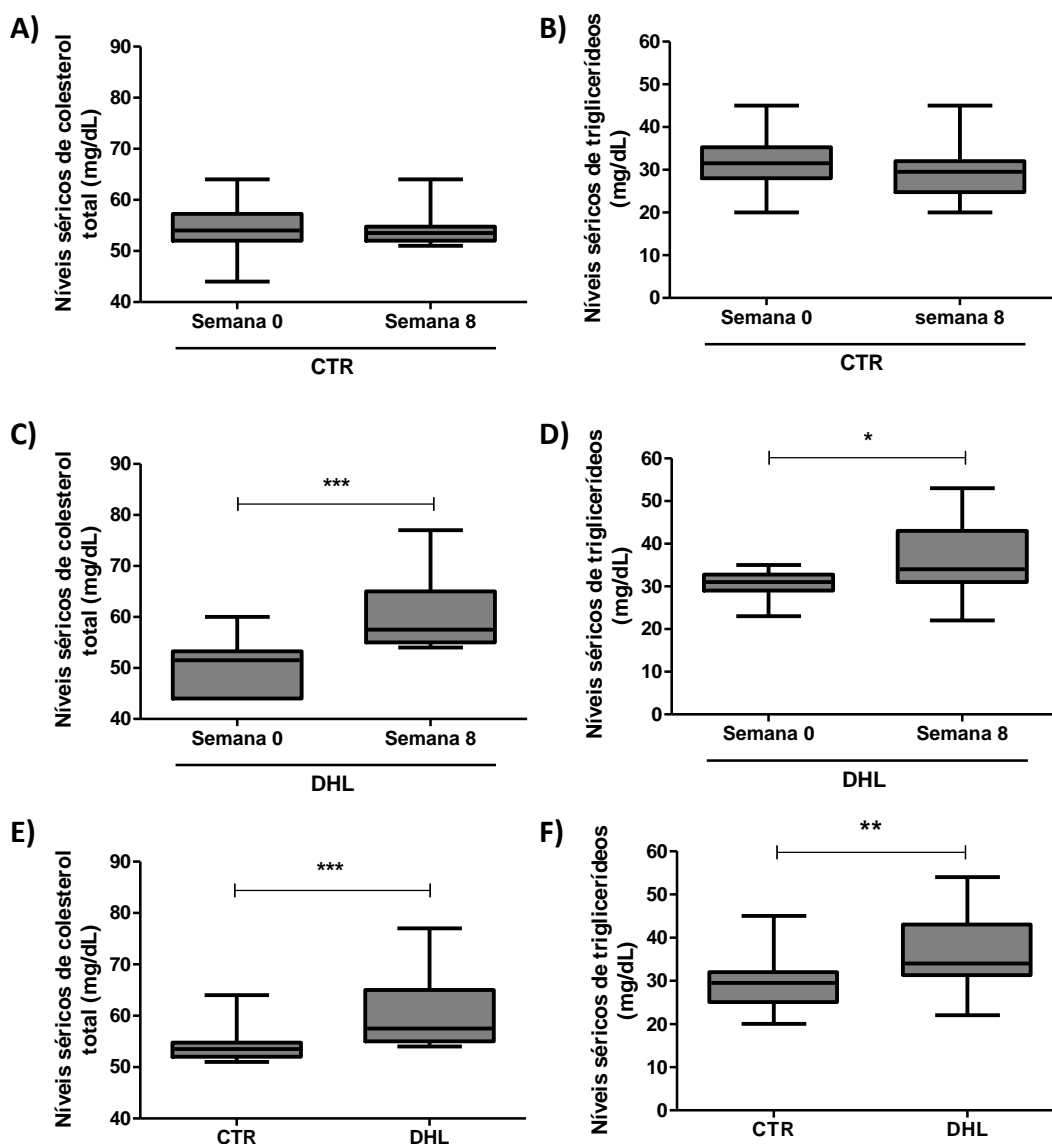


Figura5. (A – D) Comparação dos níveis séricos de colesterol total e triglicerídeos entre a semana 0 e a semana 8 nos grupos CTR e DHL (teste de Wilcoxon). (E) Avaliação do colesterol total e (F) triglicerídeos níveis séricos em CTR e DHL após oito semanas (fim da fase de indução). Dados expressos como intervalo mediano e interquartil (teste de Mann Whitney). Diferenças significativas entre os grupos são descritas como * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

5.4 Fase experimental de tratamento do estado dislipidêmico

Após as quatro semanas correspondentes à fase de tratamento experimental, o ganho de peso corporal relativo no DHL-Veículo ($46,8 \pm 1,6\%$) e DHL-EHPV ($41,9 \pm 0,7\%$) foi significativamente maior do que no CTR ($36,46 \pm 1,3\%$) ($p < 0,001$ e $p < 0,01$, respectivamente). Apesar disso, o ganho observado em DHL-EHPV foi significativamente menor do que no DHL-Veículo ($p < 0,01$). Em relação às medições de InL, os valores médios obtidos em CTR ($448,4 \pm 9,1$) foram significativamente inferiores aos do veículo DHL

($556,5 \pm 11,7$) ($p < 0,05$), mas estatisticamente semelhantes ao DHL-EHPV ($510,2 \pm 12,9$) ($p > 0,05$).

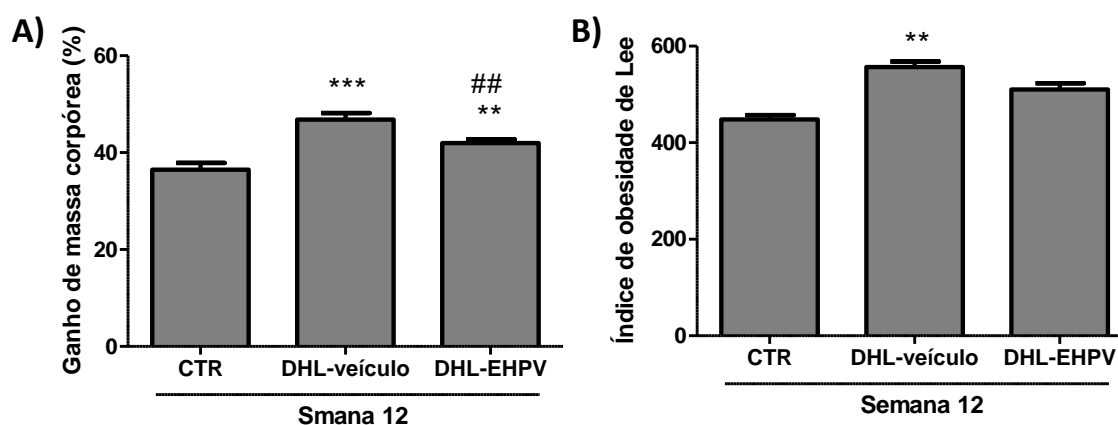


Figura 6. (A) Avaliação do ganho de peso corporal relativo e (B) índice de obesidade de Lee no grupo experimental no final da fase de tratamento. Os dados são expressos como média \pm SEM. Diferenças significativas em comparação com CTR são descritas como ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$; diferenças significativas n comparação com DHL-Veículo são descritas como ## $p < 0,01$ (análise de variância e comparações múltiplas teste de Tukey).

Conforme demonstrado na Fig. 7, a análise do perfil de soro lipídico revelou aumento significativo de CT em DHL-Veículo ($97,3 \pm 4,4$ mg / dL) e DHL-EHPV ($79,3 \pm 3,0$ mg / dL) em comparação com CTR ($51,6 \pm 1,6$ mg / dL) ($p < 0,001$ e $p < 0,05$, respectivamente). No entanto, o CT foi menor no grupo tratado com EHPV do que no tratado apenas com o veículo ($p < 0,05$). Da mesma forma, os valores médios de TG em ambos os DHL ($66,1 \pm 2,5$ mg / dL) e DHL-EHPV ($54,6 \pm 2,5$ mg / dL) foram significativamente maiores do que em CTR ($35,3 \pm 0,7$ mg / dL), mas não observou-se diferença significativa entre os grupos tratados com EHPV e com o veículo ($p > 0,05$).

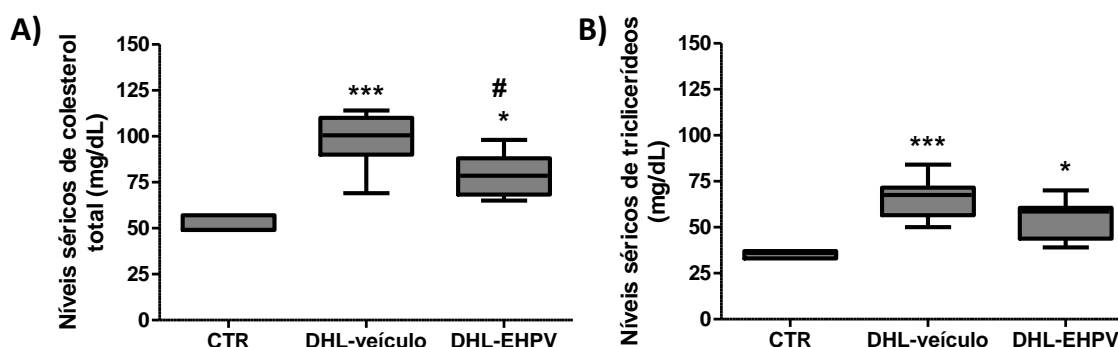


Figura 8. (A) Avaliação dos níveis séricos de colesterol total e (B) triglicerídeos em animais com dieta normolipídica e água destilada (CTR), animais dislipidêmicos tratados com veículo (DHL-Veículo) e animais dislipidêmicos tratados com extrato hidroalcoólico de própolis vermelha (DHL-EHPV) no final da fase de tratamento. Os dados são expressos como intervalo mediano e interquartil (teste de Kruskal-Wallis e teste de comparação múltipla de Dunn). Diferenças significativas em comparação com CTR são descritas como *** $p < 0,001$ e * $p < 0,05$; significativa diferença em comparação com DHLsão relatados como # $p < 0,05$.

O peso médio significativo do tecido adiposo abdominal dos animais revelado no final da fase de tratamento (12 semanas) foi significativamente aumentado no DHL-Veículo ($2,19 \pm 0,12$ g / g) e DHL-EHPV ($1,57 \pm 0,06$ g / g) do que no CTR ($0,77 \pm 0,11$ g / g) ($p < 0,001$ e $p < 0,05$, respectivamente). No entanto, o tratamento com EHPV reduziu significativamente o peso médio do tecido adiposo abdominal em comparação com o grupo tratado com veículo ($p < 0,05$).

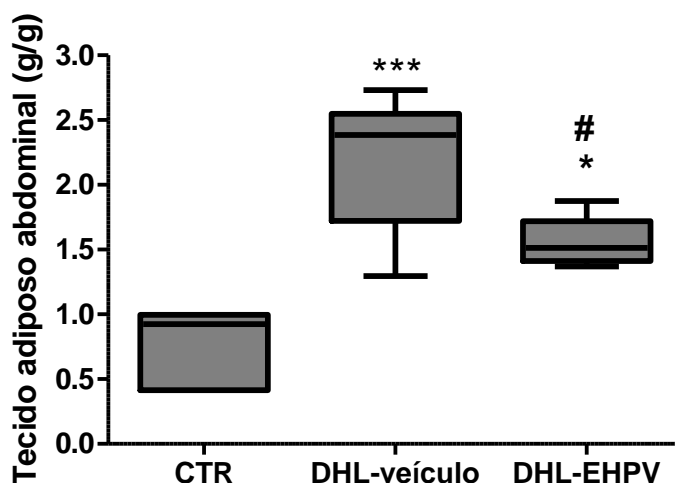


Figura7. Avaliação do peso ponderal médio do tecido adiposo abdominal nos grupos CTR, DHL e DHL-EHPV. *** $p < 0,001$ representa diferença significativa em relação ao grupo CTR, teste ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey). Os dados são expressos como intervalo mediano e interquartil (teste de Kruskal-Wallis e teste de comparação múltipla de Dunn). Diferenças significativas em comparação com CTR são descritas como *** $p < 0,001$ e * $p < 0,05$; significativa diferença em comparação com DHL-Veículo são relatados como # $p < 0,05$.

5.5 Análise histomorfológica dos órgãos excisionados

5.5.1 Análise histomorfológica dos espécimes renais

O grupo CTR (submetido à dieta normolipídica padrão) apresentou cortical exibindo corpúsculos de Malpighi típicos formados por um envelhecimento de capilares (tufos glomerulares) regulares, e limitados externamente pela cápsula de Bowman. Os espaços de Bowman dos corpúsculos, localizado entre os tufos glomerulares e as cápsulas de Bowman, se apresentam relativamente estreitos e homogêneos. Os túbulos renais proximais, formados por epitélio cuboidal alto fortemente acidófilo e luz estreitada, e distais, limitados por epitélio cúboidal baixo (quase pavimentoso), se apresentavam dispersos pela cortical renal, sem alterações morfológicas substanciais. Na zona medular foi observada uma série de tubulações com epitélio de revestimento variando de cúbico à plano (túbulos coletres e alças de Henle), permeados por pequenos capilares (Figura 9).

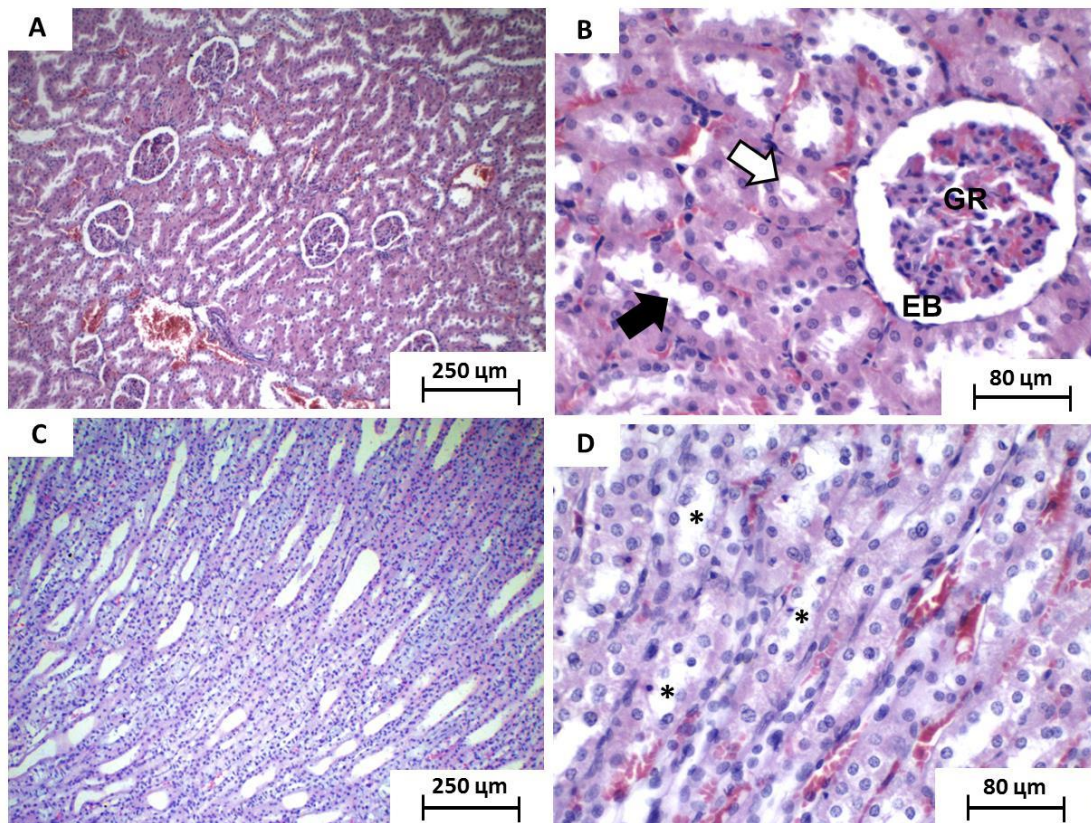


Figura 9. Fotomicrografias de secções histológicas coradas em HE de espécimes renais do grupo CTR (tratado com dieta normolipídica). (A) Zona cortical mostrando corpúsculos glomerulares com diâmetros relativamente regulares e homogêneos, bem como túbulos renais proximais e distais bem distribuídos, permeados por vasos sanguíneos hiperemiados (100x). (B) Maior detalhe do tufo glomerular renal (GR), circundado pelo espaço de Bowman (EB), e túbulos proximais (seta branca) e distais (seta negra) exibindo características morfológicas usuais (400x). (C) Zona medular exibindo múltiplas estruturas tubulares paralelas entre si, com citoplasma pouco acidófilo, representando túbulos coletores e alças de Henle (100x). (D) Maior detalhe da fotomicrografia anterior destacando os túbulos coletores (*) medulares (400x).

No grupo DHL-Veículo (submetido à dieta hiperlipidêmica e tratado com veículo) foram evidenciadas, na zona cortical, extensas áreas de retração do tufo glomerular e relativo do espaço de Bowman, acúmulo de grande quantidade de material hialino de aspecto proteináceo na luz dos túbulos proximais e distais, áreas focais de necrose tubular, e intensa hiperemia capilar. Na zona medular foram evidenciados túbulos coletores contendo cilindros proteináceos e intensa hiperemia (Figura 10).

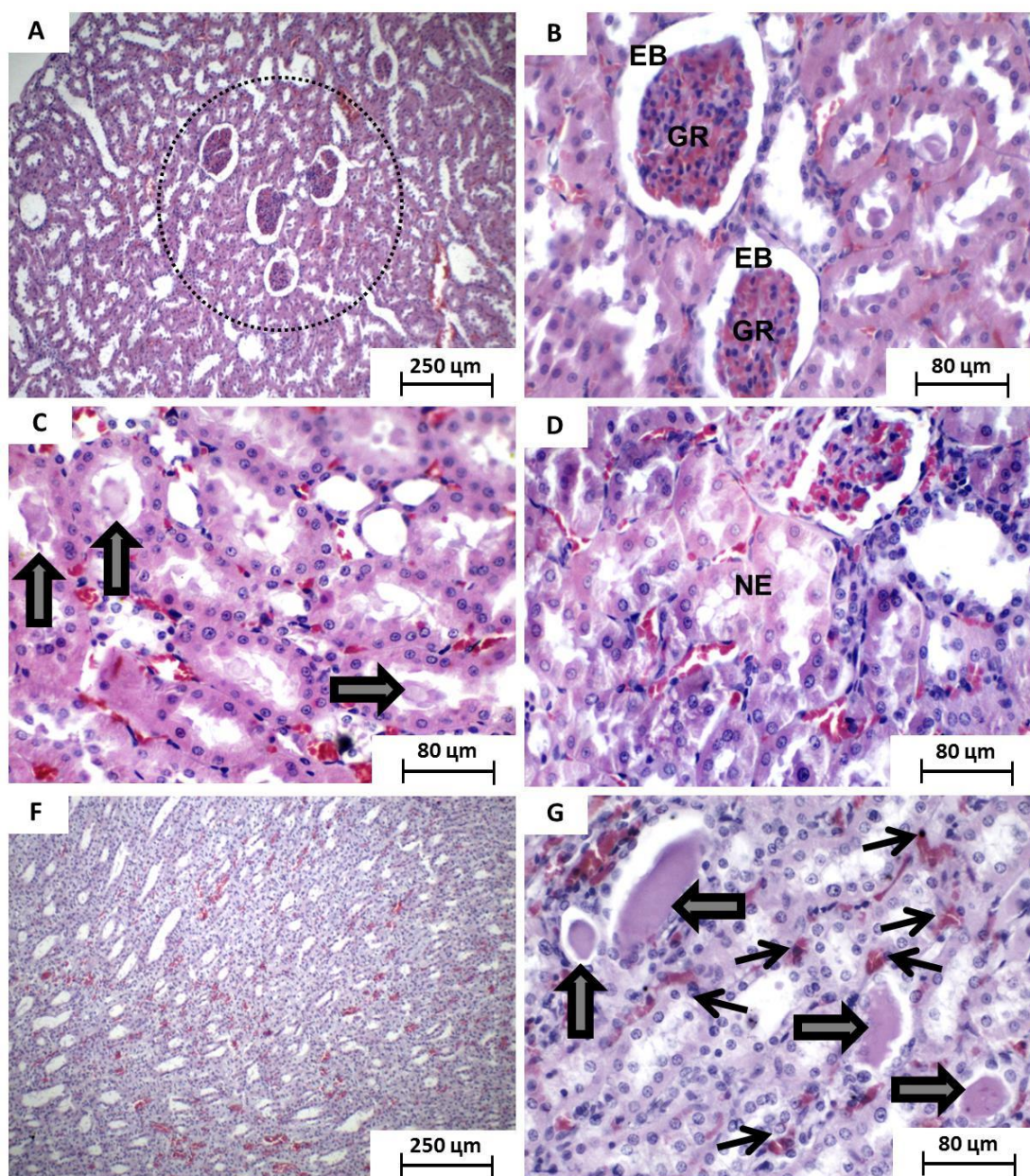


Figura 10. Fotomicrografias de secções histológicas coradas em HE de espécimes renais do grupo DHL-Veículo (submetido à dieta hiperlipídica e tratado com veículo). (A) Zona cortical mostrando corpúsculos de Malpighi exibindo retração do tufo glomerular e aumento relativo do espaço de Bowman (círculo pontilhado) (100x). (B) Maior detalhe dos tufos glomerulares retraídos (GR) e espaços de Bowman aumentados (EB) (400x). (C) Túbulos proximais e distais apresentando pronunciado acúmulo de material proteináceo (setas cinzas) e (D) áreas morfológicamente consistentes com necrose tubular (NE). (E) Zona medular exibindo intensa hiperemia (congestão vascular) e (F) túbulos coletores apresentando material proteináceo no seu interior (setas cinzas) associados a intensa hiperemia (setas delgadas negras).

No grupo DHL-EHPV (submetido à dieta hiperlipídica e tratado com EHPV 10 mg/Kg) foram evidenciadas, na zona cortical, áreas focais de corpúsculos de Malpighi com retração do tufo glomerular e acúmulo intraluminal de material proteináceo nos túbulos proximais e distais, mas em intensidade notadamente inferior àquela observada no grupo DHL-Veículo.

Na zona medular, foi notada marcante atenuação do quadro hiperêmico e ausência de cilindros proteináceos intratubulares (Figura 11).

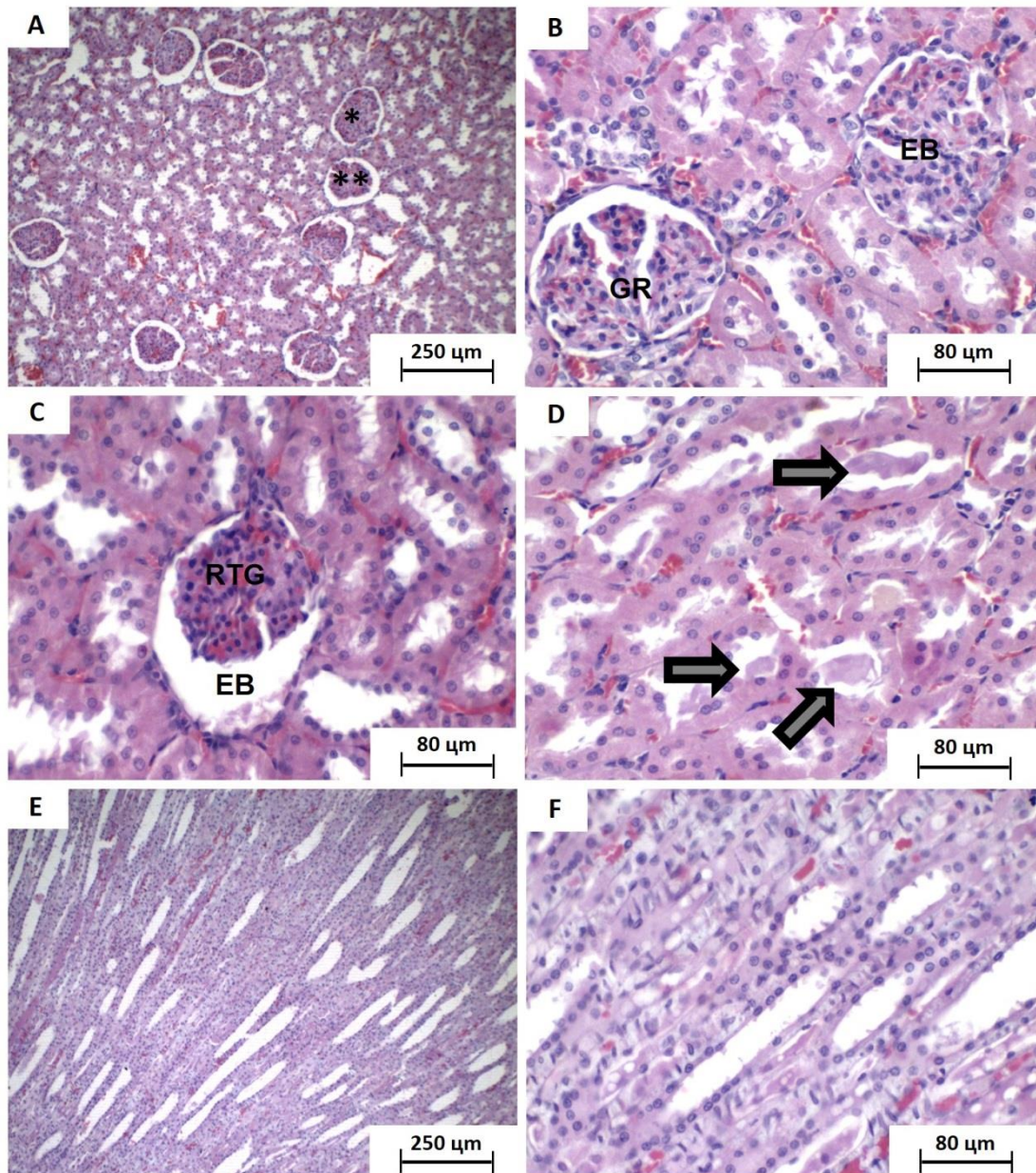


Figura 11. Fotomicrografias de secções histológicas coradas em HE de espécimes renais do grupo DHL-EHPV (submetido à dieta hiperlipídica e tratado com EHPV na dose de 10 mg/Kg). (A) Zona cortical mostrando corpúsculos de Malpighi ora exibindo retração do tufo glomerular e aumento relativo do espaço de Bowman (*) ora com características usuais (**) (100x). (B) Maior detalhe dos tufos glomerulares (GR) com características de normalidade e (C) tufos retraídos (GR) e espaços de Bowman aumentados (EB) (400x). (D) Acúmulo intraluminal focal de cilindros proteináceos nos túbulos proximais/distais (setas cinzas) (400x). (E) Zona medular exibindo atenuação do quadro de hiperemia (100x) e (F) ausência de material proteináceo intratubular (400x).

5.5.2 Análise histomorfológica dos espécimes hepáticos

No grupo CTR os hepatócitos apresentavam típica morfologia poliédrica e se agrupavam em placas formando os lóbulos hepáticos. Os hepatócitos se dispunham radialmente em monocamada em torno da veia centrolobular, apresentando sinusoides estreitos entre os cordões celulares, muitos deles contendo uma a duas hemácias. Os lóbulos se encostavam uns nos outros em quase toda extensão do espécime. De permeio, foram evidenciados diminutos ductos biliares com características usuais(Figura 12).

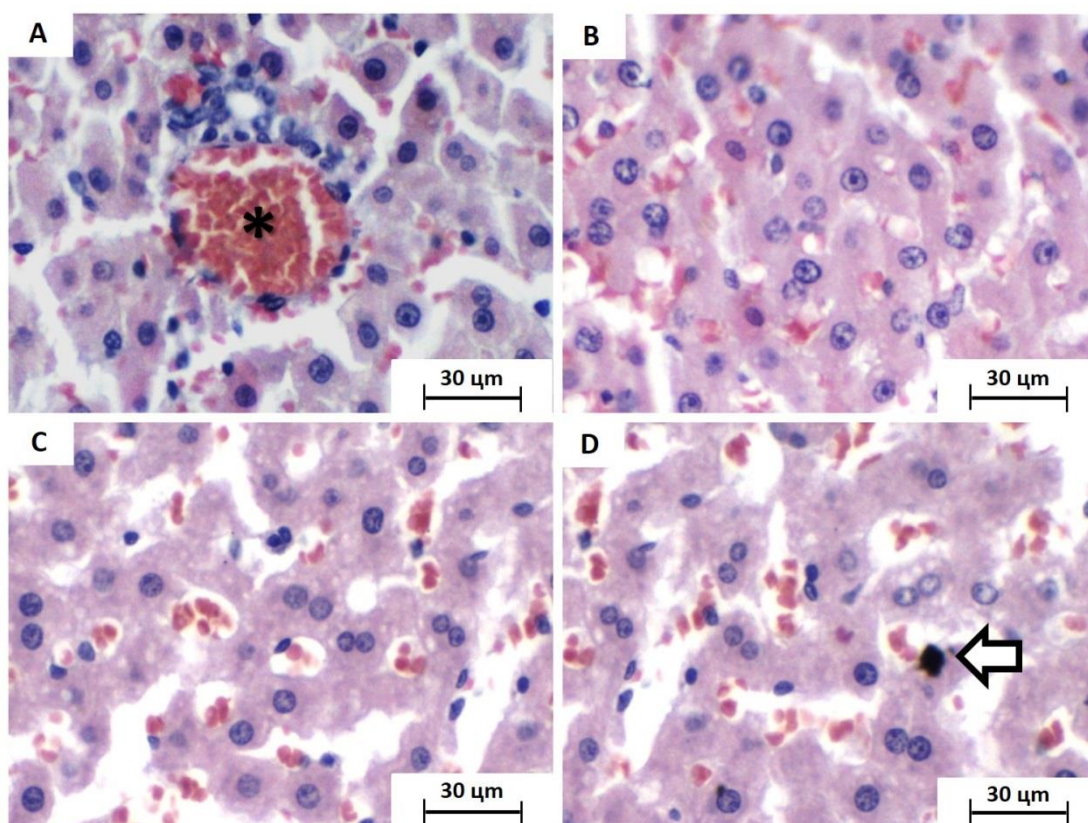


Figura 12. Fotomicrografias de secções histológicas coradas em HE de espécimes hepáticos do grupo CTR (submetido à dieta normolipídica padrão). (A) Hepatócitos exibindo morfologia poliédrica usual em torno da veia centrolobular (*) (800x). (B) e (C) Manutenção da arquitetura do parênquima hepático, com formação inúmeros espaços sinusoidais estreitos, muitos deles contendo hemácias no interior, e diminutos ductos biliares com características usuais (800x). (D) Acúmulo focal de pigmento biliar (bilirrubina) entre os hepatócitos (800x).

No grupo DHL-Veículo foi observada intensa vacuolização citoplasmática compatível com degeneração hidrópica nos hepatócitos, em especial nas áreas circunjacentes as veias centrolobulares, que se mostravam dilatadas e congestionadas. Pequenos vacúolos citoplasmáticos mais arredondados e homogêneos, de aspecto lipóide, consistentes com esteatose microvesicular, foram evidenciados em algumas áreas dos espécimes. Hepatócitos necróticos/apoptóticos e acúmulo intraductal de bilirrubina também foram achados relativamente frequentes (Figura 13).

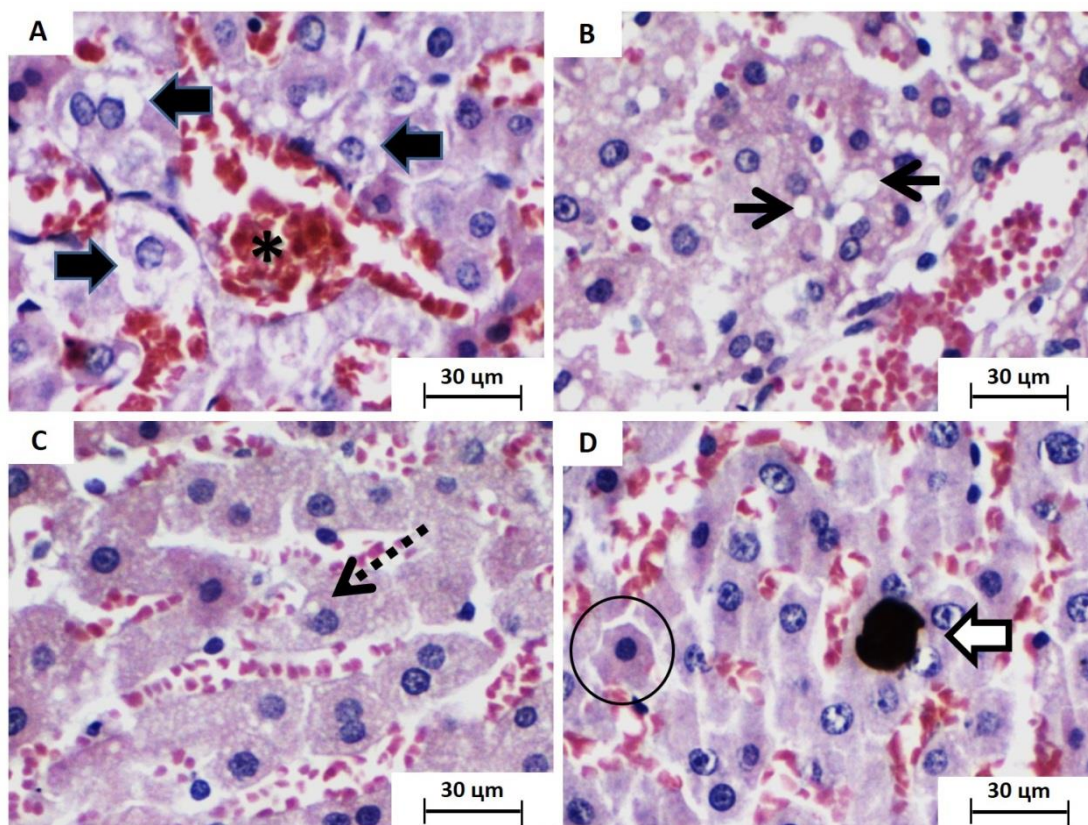


Figura 13. Fotomicrografias de seções histológicas coradas em HE de espécimes hepáticos do grupo DHL-Veículo (submetido à dieta hiperlipidêmica e tratado com veículo). (A) Hepatócitos exibindo intensa vacuolização citoplasmática irregular consistente com degeneração hidrópica (setas espessas negras) em torno da veia centrolobular(*) dilatada e congestionada (800x). (B) Desarranjo parcial da arquitetura do parênquima hepático com alargamento dos espaços portais, e hepatócitos exibindo vacuolização intracitoplasmática regular e homogênea, de aspecto lipóide, consistente com esteatose microvesicular (setas delgadas negras) (800x). (C) Áreas focais de hepatócitos exibindo perda de afinidade tintorial citoplasmática acompanhada de discreta balonização (seta tracejada). (D) Hepatócito exibindo morfologia arredondada, núcleo picnótico e citoplasma intensamente eosinofílico consistente com apoptose(círculo) e acúmulo intraductal de cilindro biliar (bilirrubina) (setas brancas)entre as células hepáticas (800x).

No grupo DHL-EHPV os hepatócitos apresentavam típica morfologia poligonal e se agrupavam em placas formando lóbulos hepáticos circunjacentes às veias centrolobulares, que se mostravam dilatadas e congestionadas. Desarranjo parcial da arquitetura do parênquima hepático com alargamento dos espaços portais, e hepatócitos exibindo vacuolização intracitoplasmática regular e homogênea, de aspecto lipóide, consistente com esteatose microvesicular, foram evidenciados em algumas áreas dos espécimes. Hepatócitos exibindo perda de afinidade tintorial citoplasmática, acompanhada de discreta balonização e acúmulo intraductal de bilirrubina também foram achados relativamente frequentes (Figura 14).

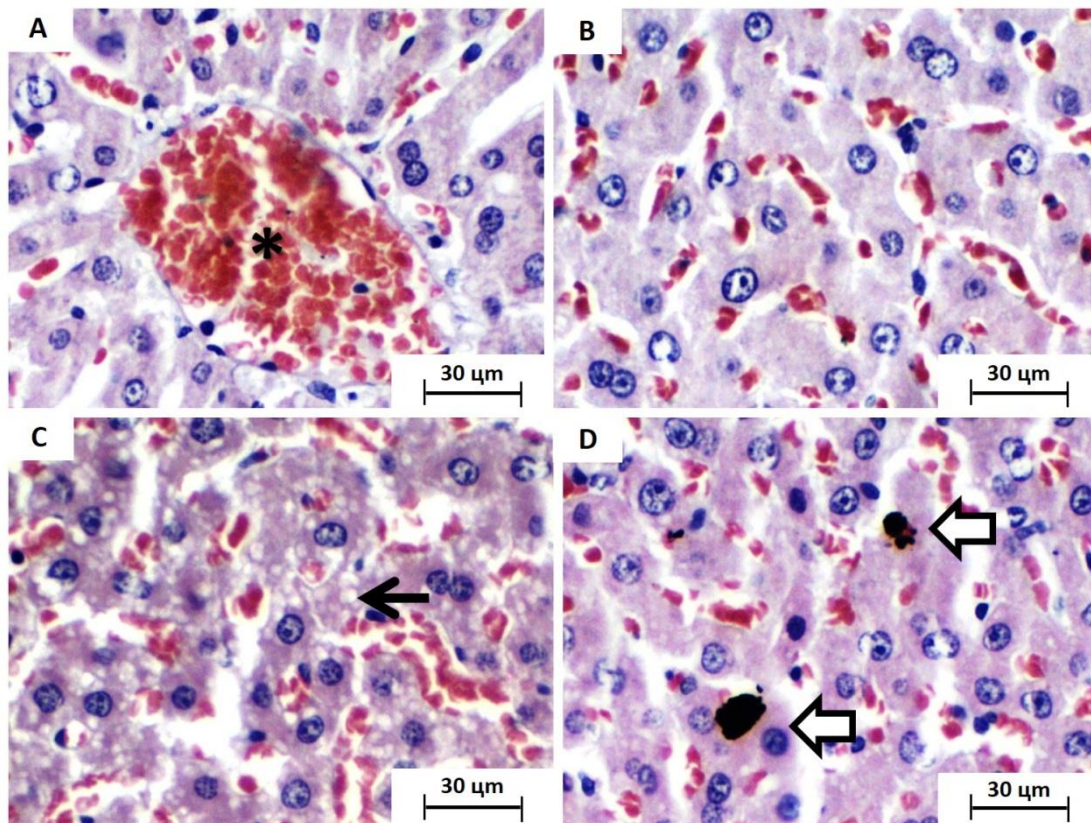


Figura 14. Fotomicrografias de seções histológicas coradas em HE de espécimes hepáticos do grupo DHL-EHPV (submetido à dieta hiperlipidêmica e tratado com EHPV 10 mg/Kg). (A) e (B) Hepatócitos exibindo morfologia usual em torno da veia centrolobular (asterisco) dilatada e congesta(800x).(C) Desarranjo parcial da arquitetura do parênquima hepático e hepatócitos exibindo vacuolização intracitoplasmática regular e homogênea, de aspecto lipóide, consistente com esteatose microvesicular (setas delgadas negras) (800x). (D) Hepatócitos exibindo morfologia arredondada, núcleos picnóticos e citoplasma intensamente eosinofílico consistente com apoptose/necrose (círculo) e acúmulo intraductal de bilirrubina (setas brancas) no tecido hepático (800x).

5.5.3 Análise histomorfológica dos espécimes intestinais (intestino grosso)

No grupo CTR (submetido à dieta normolipídica padrão), a porção terminal do intestino grosso (cólon retal) exibiu formação de múltiplas pregas rombas voltadas para a luz, revestidas por epitélio cilíndrico simples com células caliciformes, sobre uma lâmina própria de tecido conjuntivo frouxo. A submucosa era formada por tecido conjuntivo fibroso moderadamente colagenizado. A presença de reação inflamatória era bastante rara e limitada a infiltração de poucos linfócitos na submucosa (Figura 15).

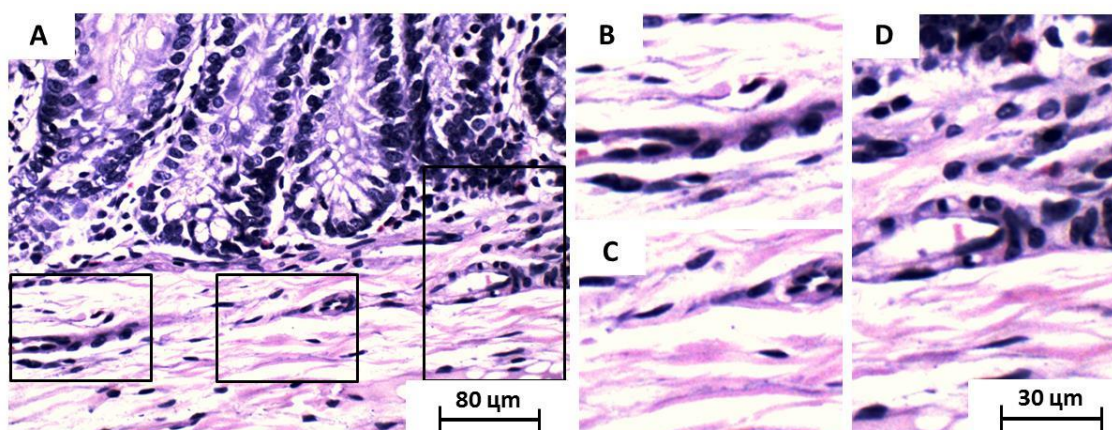


Figura 15. Fotomicrografias de secções histológicas coradas em HE de espécimes da porção terminal do intestino grosso do grupo CTR (submetido à dieta normolipídica padrão). (A) Observar epitélio da mucosa bem preservado apresentando características usuais (400x) e (B e C) submucosa representada por tecido conjuntivo fibroso moderadamente colagenizado e (D) sede de discreto infiltrado inflamatório mononuclear (800x).

No grupo DHL-Veículo (submetido à dieta hiperlipidêmica e tratado com veículo), a submucosa da porção terminal do intestino grosso exibiu moderada infiltração inflamatória rica em linfócitos e polimorfonucleares neutrófilos e eosinófilos, além de edema intersticial profuso (Figura 16).

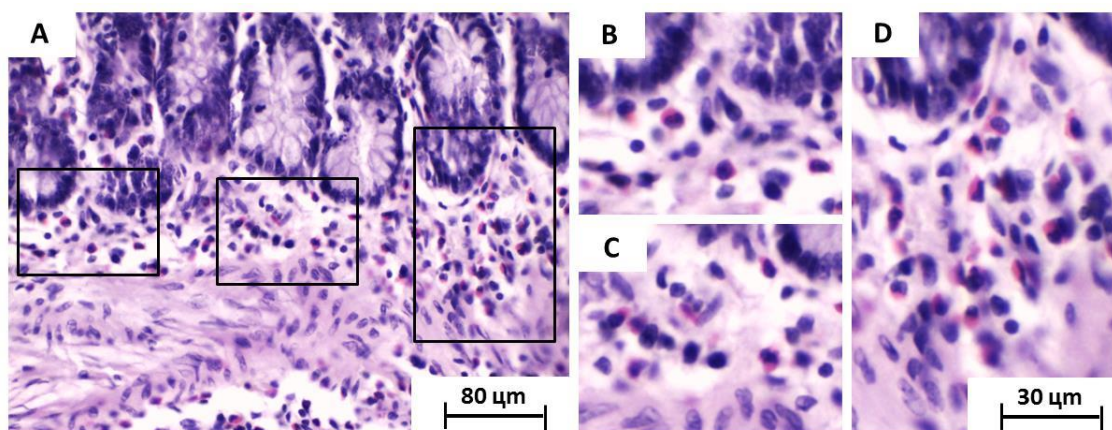


Figura 16. Fotomicrografias de secções histológicas coradas em HE de espécimes da porção terminal do intestino grosso do grupo DHL (submetido à dieta hiperlipidêmica e tratado com veículo). (A) Observar epitélio da mucosa íntegro (400x) e (B, C e D) discreta e focal infiltração inflamatória da submucosa, rica em linfócitos e eosinófilos, além de edema intersticial profuso (800x).

No grupo tratado com EHPV na dose de 10 mg/Kg (Figura 17) foram observadas áreas de discreto infiltrado inflamatório linfo-histiocitário com presença de ocasionais eosinófilos na submucosa. Deve ser destacado que as áreas de infiltração inflamatória se mostraram esparsamente distribuídas e em intensidade notadamente menos expressiva que em DHL-Veículo.

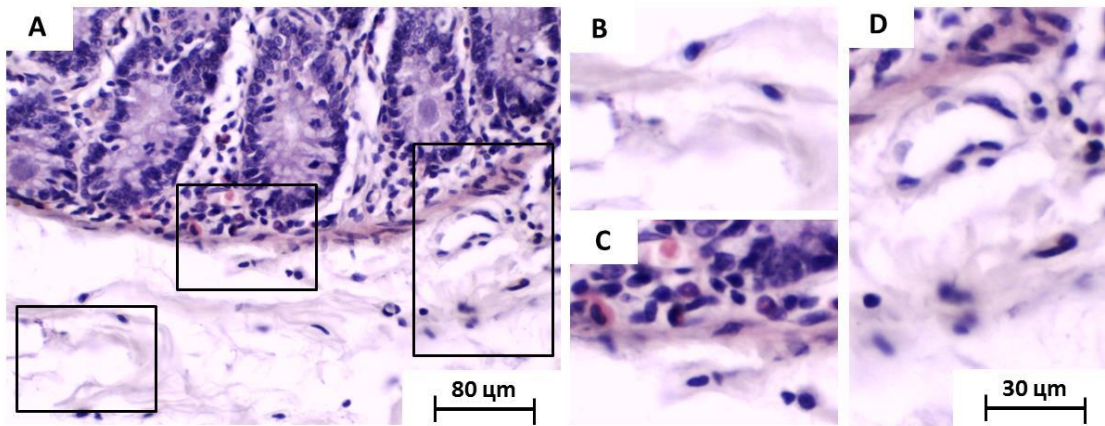


Figura 17. Fotomicrografias de secções histológicas coradas em HE de espécimes da porção terminal do intestino grosso do grupo DHL-EHPV (submetido à dieta hiperlipidêmica e tratado com EHPV 10 mg/Kg). (A) Observar epitélio da mucosa íntegro e apresentando características usuais (400×), (B) Submucosa representada por tecido conjuntivo frouxo e (C) discreta e focal infiltração inflamatória rica em linfócitos e ocasionais eosinófilos, além de edema intersticial profuso (800×).

6.DISSCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

O rendimento da extração da própolis vermelha foi 17,46%, teor próximo ao estudo de Aguiar *et al.* (2018), que correspondeu a 19,2%. O estudo desenvolvido por Araújo *et al.* (2012) aponta que há heterogeneidade no rendimento do extrato hidroalcoólico da própolis vermelha, uma vez que foi encontrada variação entre 9,45% a 74,62%. Sendo assim, o rendimento do EHPV no presente estudo está entre os valores descritos na literatura. Foi anteriormente relatado que o Ministério da agricultura preconiza um rendimento de 35% como mínimo para a própolis (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2001). Contudo, este valor tem sido baseado em estudos com a variedade verde da própolis brasileira; assim, considerando que a variedade vermelha tem composição química, origem botânica, padrão sazonal e atividades biológicas distintas da verde (BURIOL *et al.*, 2009), sugere-se que o rendimento mínimo de sua extração poderia ser mais bem determinada se baseada na média obtida pelos recentes estudos neste campo. Ademais, o teor de compostos químicos do extrato pode ser otimizado por meio do solvente utilizado na extração, independentemente do rendimento (ANDREO; JORGE, 2006).

No presente estudo, a formononetina, biochanina A e daidzeína foram os principais compostos químicos identificados no EHPV. Os mesmos componentes também foram encontrados nos extratos etanólicos de própolis vermelha em estudos anteriores (LOPEZ *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2015). O perfil químico dos componentes encontrados na presente amostra é semelhante àquele que caracteriza a variedade de própolis vermelha originada da *Dalbergia ecastophyllum*, sugerindo que elas podem ter a mesma origem botânica (DAUGSHS *et al.*, 2008).

A quantificação de formononetina (9,21 mg/g) e biochanina A (7,08 mg/g) encontrada no EHPV deste estudo foi similar ao teor previamente relatado por Daugshs (2008) (10,2 mg/g), e superior em relação a biochanina A (0,5 mg/g). A formononetina foi o composto químico majoritário, assim como foi relatado por Mendonça *et al.* (2015) em amostras de própolis vermelha proveniente do nordeste brasileiro. As diferenças detectadas nos diversos compostos químicos presentes na própolis vermelha podem ser decorrentes de variações substanciais na composição química do EHPV ocasionadas por diferenças climáticas sazonais e variabilidade na composição do pasto apícola (SILVA *et al.*, 2015; MENDONÇA *et al.*, 2015). Por esta razão, Cavendish *et al.* (2015) obteve maior teor de formononetina (21,62 mg/g) em amostras de própolis vermelha adquirida na mesma localidade de coleta desta utilizada no presente estudo.

No presente estudo, buscou-se analisar o efeito da administração oral do EHPV sobre quadro dislipidêmico em condições experimentais. Para tanto, o primeiro desafio foi estabelecer um modelo de indução de dislipidemia em roedores relativamente simples e de fácil controle, e que refletisse características da dieta regional. O uso de dietas hipercalóricas e hiperlipídicas destacam-se como modelo experimental de indução à dislipidemia, devido à similaridade com a gênese e as respostas metabólicas destas condições em humanos (SILVA *et al.* 2010; ROSINI *et al.* 2012). Neste sentido, a escolha alimentar para suplementar e fornecer lipídeos à dieta no presente estudo foi a manteiga líquida de garrafa. Esta opção se baseou em seu elevado teor de colesterol, de aproximadamente 309mg/L, que está substancialmente acima do que consta na Tabela de Composição Nutricional dos Alimentos Consumidos no Brasil (205mg/100g) (IBGE, 2009). Além disso, esta constitui um produto de uso corriqueiro em muitas localidades da região Nordeste (CLEMENTE; ABREU, 2008), agregando valor regional ao modelo de estudo.

Estudos desenvolvidos anteriormente, como o de Barnes *et al.* (2003); Estadella *et al.* (2004); Guerra *et al.* (2007) e Silva *et al.* (2010) utilizaram ratos machos para indução de obesidade e dislipidemia por meio do uso de dieta hiperlipídica em períodos de 08 a 12 semanas. Adicionalmente, Halima *et al.* (2018) desenvolveu quadro dislipidêmico em 9 semanas de experimento. Apesar de usarem modelos de indução distintos daquele empregado no presente estudo, essas pesquisas embasaram o delineamento do período experimental de oito semanas aqui utilizado.

Neste estudo, o uso da dieta hiperlipídica aumentou significativamente os níveis de colesterol total e triglicerídeos. Os valores de referência para CT e TG em *Rattus norvegicus* linhagem *Wistar* machos, foram discriminados nos estudos de Dantas *et al.*, (2006); Melo *et al.*, (2012) e Lima *et al.*, (2014), variando de aproximadamente 40 e 90 mg/dL para CT e de 22 a 100 mg/dL para TG. Apesar da variação nesses valores de referência foi possível observar aumento significativo dos constituintes lipídicos séricos dos animais com dieta hiperlipídica quando comparado aos valores no tempo inicial, caracterizando o quadro de dislipidemia. Tal aumento também foi relatado nos estudos de Kaupet *et al.* (2011) e Colina-coca *et al.*, 2017, nos quais a utilização de suplementação dietética rica em colesterol causou o aumento dos níveis de CT e TG em ratos *wistar*.

Também foi observado aumento significativo no ganho percentual de massa corpórea nos animais submetidos à suplementação dietética hiperlipídica em relação ao grupo controle durante a fase de indução. A relação entre o consumo elevado de gordura e o ganho de massa corpórea apresenta razões variadas desde o estilo de vida aos fatores genéticos determinantes. Entretanto, tem sido relatado que o aumento no consumo de lipídeos não estimula de forma proporcional a sua oxidação, de modo que o

excesso não metabolizado pode gerar seu acúmulo em forma de gordura corporal (PEREIRA *et al.*, 2003). Além disso, o aumento de depósitos adiposos tem sido associado à redução da secreção da leptina, um hormônio anorexígeno que atua na regulação da saciedade, podendo resultar em quadros de hiperfagia (LIMA *et al.*, 2016). Desta forma, o ciclo vicioso gerado a partir da inter-relação entre o acúmulo de tecido adiposo, secundário a dieta hiperlipídica, e a disfunção dos sistemas regulatórios da saciedade, relacionados à leptina, poderiam justificar o ganho de massa corpórea observado no presente estudo.

Um ponto de especial interesse observado no modelo experimental utilizado no presente estudo foi o fato de que, mesmo depois de encerrado o período de indução, e, portanto, de suplementação hiperlipídica da dieta, os níveis de colesterol e triglicerídeos continuaram a aumentar significativamente. Este aparente paradoxo parece sugerir que a simples suspensão da suplementação lipídica dietética, por si só, não é capaz de normalizar os níveis lipídicos séricos, pelo menos em curto prazo. De fato, Menegassiet *al.* 2017 apontam que, para acelerar a normalização do perfil lipídico seria necessária a implementação de estratégias adicionais, a exemplo de intervenções dietéticas específicas e/ou realização de atividade física.

Embora não tenha impedido o aumento dos níveis séricos de colesterol total nas quatro semanas posteriores à fase de indução de dislipidemia (fase de tratamento), este aumento foi significativamente menor nos animais submetidos à administração oral de EHPV. Até o presente momento, estes dados representam as primeiras evidências *in vivo* de que o EHPV poderia funcionar como uma estratégia complementar para o tratamento e controle de dislipidemia. No entanto, embora ainda não esteja claro qual etapa do metabolismo dos ácidos graxos poderia ter sido influenciada pelo extrato, se a absorção dietética, biossíntese endógena ou eliminação do colesterol e derivados, algumas teorias podem ser hipotetizadas. Lio *et al.* (2010) demonstraram que o extrato etanólico da própolis vermelha brasileira é capaz de aumentar a expressão de receptores ativados por proliferador de peroxissoma (PPAR γ – do inglês *peroxisome proliferator-activated receptor*).

A PPAR γ também parece ser capaz de estimular *clearance* de ácidos graxos pelo tecido adiposo, com conseqüente diminuição na concentração plasmática e transporte para o músculo (Tavares *et al.*, 2007), o que parece dar alicerçar o efeitos hipolipêmico obtido no presente estudo. Além disso, também foi demonstrado que a PPAR γ atua na regulação da expressão da acetil-CoA, uma enzima envolvida na biossíntese de ácidos graxos. Os dados obtidos na literatura parecem sugerir que o EHPV poderia atuar tanto na regulação da biossíntese quanto no *clearance* sanguíneo do colesterol.

Surpreendentemente o tratamento com EHPV não promoveu alterações significativas nos níveis de TG ao final do período experimental. Uma vez mais as razões determinantes deste resultado, aparentemente paradoxal, não estão ainda elucidadas. Contudo, uma vez que a biossíntese de triglicerídeos envolve não apenas a maior disponibilidade de ácidos graxos livres oriundos da dieta, mas também de glicose, seria possível supor que, como não houve, em nenhum momento ao longo do experimento, redução da oferta de compostos glicídicos (MILANE; JORDÃO, 2008), isto se expressaria em menor efeito sobre a biossíntese endógena dos TG. Além disso, não foi realizada, no presente estudo, estratégias de aumento da mobilização de TG, como ocorreria em situações de balanço energético negativo, o que também pode ter concorrido para o menor impacto do tratamento com EHPV sobre os níveis séricos destes lipídeos (SOUZA *et al.*, 2010).

Os efeitos da administração oral de EHPV sobre parâmetros clínicos e macroscópicos relacionados ao tecido adiposo também foram analisados no presente estudo. O índice de Lee, adotado no presente mimetiza, em roedores, o cálculo do IMC (índice de massa corpórea) em humanos e representa um dos principais parâmetros para estudo da obesidade em modelo murino (SOUZA *et al.*, 2001). Contudo, tem sido relatado que, quando tomado isoladamente, este seja considerado insatisfatório para estimar a massa livre de gordura em animais de mesma idade e de mesma história nutricional (BERNARDIS; PATTERSON, 1968; NOVELLI *et al.*, 2007). Desta forma, foi também analisada a gordura massa ponderal de tecido adiposo abdominal nos animais submetidos aos diferentes tratamentos ao fim das 12 semanas experimentais, com o intuito de subsidiar e corroborar os dados obtidos por meio do índice de Lee. O fato de que o índice de Lee aumentou progressiva e significativamente ao longo do tempo (índice de Lee > 300) nos animais submetidos à suplementação dietética hiperlipídica vem corroborar os dados bioquímicos anteriormente discutidos, e sugerem que o modelo experimental foi eficaz em gerar um quadro de disfunção do metabolismo lipídico em ratos (ESTADELLA *et al.*, 2004; TAKASHIBA *et al.*, 2011). Estes dados são plenamente ratificados pela análise da massa média de tecido adiposo abdominal significativamente maior nos grupos que utilizaram, na fase de indução, dieta hiperlipídica.

A administração oral de EHPV evitou o aumento significativo do índice de Lee após encerrada a fase de suplementação hiperlipídica e promoveu alteração significativa na massa ponderal de tecido adiposo abdominal. Esses dados sugerem que, o EHPV apresentou potencial efeito hipocolesterolêmico, mostrou-se eficiente para induzir mobilização lipídica e minimizar, pelo menos em curto prazo, o acúmulo de gordura abdominal. Adicionalmente, para reverter o TA, eles parecem advogar em favor da

implementação de estratégias interdisciplinares para o controle dos parâmetros lipídicos, como exercícios físicos e intervenções dietéticas específicas.

No presente estudo, a dieta hiperlipídica promoveu alterações patológicas expressivas nos espécimes hepáticos e renais, que foram minimizadas com o uso de EHPV.

A relação entre dieta hiperlipídica e alterações da estrutura/função renal tem sido relatada na literatura, disfunções metabólicas, reação inflamatória induzida por lipotoxicidade e hiperfluxo renal são alguns dos fatores que associam o excesso de lipídeos à injúria renal (PAPAFRAGKAKI, TOLIS, 2005; MADDIX *et al.*, 2002; XU *et al.*, 2005; GUEDES *et al.*, 2010). As alterações renais vistas em modelos experimentais de indução à dislipidemia incluem aumento da área do tufo glomerular, glomeruloesclerose, expansão mesangial, espessamento da cápsula de Bowman, infiltrado inflamatório e acúmulo de lipídios no tecido renal (KAMBHAM *et al.*, 2001; WU *et al.*, 2006; ALTUNKAYNAK *et al.*, 2008; DEJI *et al.*, 2009). As alterações morfológicas observadas no presente estudo corroboram, portanto, os achados descritos na literatura.

No mesmo sentido, os espécimes hepáticos podem apresentar nos cortes histológicos alterações na estrutura tecidual em consequência da exposição à dieta hiperlipídica. O estudo desenvolvido por Rocha *et al.* (2012) observou que condições hipercolesterolêmicas em ratos promoveram vacuolização lipídica no citoplasma dos hepatócitos. A vacuolização ou degeneração dos hepatócitos (esteatose hepática) pode ocorrer quando um agente interfere no metabolismo dos ácidos graxos da célula, aumentando a síntese ou dificultando a utilização, transporte ou excreção. Esses achados também foram evidenciados no presente estudo. Além disso, a ocorrência da esteatose especialmente nas áreas circunjacentes às veias centrolobulares parece sugerir que essa região do ácino hepático, por receber o menor fluxo de oxigênio, seria mais susceptível a lesão do que a zona mediolobular e periportal (QUARESMA *et al.*, 2007). Outra alteração importante foi o acúmulo de bilirrubina intraductal e intracelular, que estaria relacionado necessidade de excreção aumentada de colesterol secundária ao quadro de hipercolesterolemia (DIAS *et al.*, 2008). Também merece destaque o fato de que o acúmulo de ácidos biliares hidrofóbicos durante a colestase conduz à lesão mitocondrial de hepatócitos, consistindo em um mecanismo de “injúria cíclica” decorrente da hiperlipidemia (KESH *et al.*, 2013).

Diferente dos mecanismos bioquímicos que determinam a injúria hepatorenal, os fenômenos fisiopatológicos responsáveis pela minimização das alterações histológicas observadas nesses tecidos ainda precisam ser elucidados. Uma vez que níveis lipídicos

elevados tem sido associados com vários marcadores inflamatórios, como proteína C-reativa, TNF- α , IL-6, NF κ B, moléculas de adesão, α -amilóide sérico e fosfolipase A2 associada a lipoproteína dentre outros (SIASOS *et al.*, 2011), provavelmente em resposta a um aumento do estresse oxidativo, é possível supor que a utilização de compostos antioxidantes e anti-inflamatórios poderia ser útil na minimização dos danos teciduais nesses órgãos. De fato, Cavendish *et al.* (2015) demonstrou que a mesma amostra de própolis vermelha empregada neste estudo, também na dose de 10 mg/Kg, apresentou importante atividade anti-inflamatória e antioxidante. Além disso, o aumento da expressão das PPAR- γ induzido por EHPV, e relatado por Lio *et al.* (2010), poderia levar a uma modulação indireta da atividade de lipases lipoproteicas e a expressão de proteínas transportadoras de ácidos graxos (FATP-1 e CD36), ambas envolvidas na captação e transporte intracelular de lipídeos (TAVARES *et al.*, 2007), o que poderia estar associado a redução do dano hepático.

É relatado que condições dislipidêmicas/hiperlipidêmicas são capazes de alterar as condições fisiológicas que determinam a colonização entérica e formação da microbiota intestinal (MUSSO *et al.*, 2010; THURRSBY, JUGE, 2017). Nesse sentido, as mudanças na microbiota intestinal secundária a quadros de obesidade associadas a alterações do perfil lipídico sérico determinam alterações na permeabilidade da mucosa intestinal, com consequência penetração de bactérias potencialmente patógenas na mucosa entérica e indução de reação inflamatória na mucosa intestinal (CANI *et al.*, 2009). Estudos recentes realizados com modelo experimental de colite induzida por ácido acético em ratos mostraram que a administração de EHPV promove importante efeito anti-inflamatório, aparentemente por modular a intensidade do estresse oxidativo via redução da expressão da sintase de óxido nítrico pelas células epiteliais entéricas (BARBOSA *et al.*, 2017). Isso leva a sugestão de que a menor intensidade da infiltração inflamatória observada no presente estudo poderia ser resultado de uma ação anti-inflamatória/antioxidante direta induzida pelo extrato. Outra possibilidade, menos estudada e, portanto, ainda no terreno hipotético, seria que o efeito hipolipidêmico induzido pelo EHPV (observado neste estudo) poderia favorecer a recomposição da microbiota intestinal convencional e, assim, minimizar, secundariamente, o efeito agressor sobre a mucosa intestinal.

Tomados em conjunto, os dados bioquímicos obtidos no presente estudo fornecem evidências de que a utilização do EHPV apresenta efeito hipolipidêmico em modelo experimental, e que os níveis séricos de colesterol parecem ser mais susceptíveis a ação dos compostos químicos presentes no extrato do que os de triglicerídeos. No entanto, apesar de algumas hipóteses terem sido aqui postuladas, estudos posteriores são

necessários a fim de esclarecer as vias metabólicas e mecanismos fisiopatológicos envolvidos nessa atividade biológica.

7. CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

Nesse presente estudo foi possível perceber que o modelo de indução a dislipidemia utilizando manteiga líquida é eficiente. Ademais, tal modelo também pode ocasionar a obesidade em ratos. O EHPV mostrou-se rico em compostos fenólicos (daidzeína, formononetina e biochanina A) e os bioativos presentes demonstraram a primeiras evidências experimentalmente *in vivo* do efeito hipolipidêmico, assim como, reparou os danos teciduais vistos nos espécimes histológicos.

REFERÊNCIAS

- ABARCA-GÓMEZ, L.; ABDEEN, ZA.; HAMID, ZA.; ABU-RMEILEH, N. M.; ACOSTA-CAZARES, B.; ACUIN, C. Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128.9 million children, adolescents, and adults. *Lancet* 2017; 390 (10113): 2627-2642.
- AGUIAR, G. R.; DE LEMOS, T. L. G.; DORNELAS, C. A.; DA SILVA, A. M.; DE ALARCON, G.; ROCO, J.; MEDINA, M.; MEDINA, A.; PERAL, M.; JEREZ, S. High fat diet-induced metabolic all y obese and normal weight rabbit model shows early vascular dysfunction: mechanisms involved. *Int J Obes* 2018; 1-9.
- ALMEIDA, M. C. S.; FERREIRA, D. A.; MONTE, F. J. Q.; BRAZ-FILHO, R.; DE ALTUNKAYNAK, M.E., ÖZBEK, E., ALTUNKAYNAK, B.Z., CAN, I., UNAL, D., UNAL, B., The effects of high-fat diet on the renal structure and morphometric parametric of kidneys in rats. *Journal of Anatomy* 2008; 212:845-852.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. CLASSIFICATION AND DIAGNOSIS OF DIABETES. SEC. 2. IN STANDARDS OF MEDICAL CARE IN DIABETES. [online]. 2016 [acessado em 20 de abril de 2017]. Disponível em: http://care.diabetesjournals.org/content/suppl/2015/12/21/39.Supplement_1.DC2/2016-Standards-of-Care.pdf
- ANDERSEN, J.R.; AASPRANG, A.; BERGSHOLM, P.; SLETTESKOG, N.; VAGE, V.; NATVIG, G.K. Anxiety and depression in association with morbid obesity: changes with improved physical health after duodenal switch. *Health Qual Life Out comes* 2010; 8(52): 1-7.
- ANDREO, D.; JORGE, N. Natural antioxidants: extraction techniques. *Digital library of journals* 2006; 24 (2): 320-336.
- ARAUJO, Y.L.F.M.; SOUZA, C.O.; DRUZIAN, J.I.; PADILHA, F.F.; ORELLANA, S.C. Uso de biofilme de amido à base de própolis vermelha para a conservação de folhas de alface (*Lactuca sativa*). *Scientia Plena* 2012; (8): 1-8.
- ARCIERO, P.J.; ORMSBEE, M.J.; GENTILE, C.L.; NINDL, B.C.; BRESTOFF, J.R. Increased protein intake and meal frequency reduces abdominal fat during energy balance and energy deficit. *Obesity (Silver Spring)* 2013; 21(7): 1357-1366.
- ARROYO-JOHNSON, C.; MINCKEY, K.D. Obesity Epidemiology Worldwide. *Gastroenterol Clin North Am* 2016; 45 (4): 571-579.
- ASSINI, J.M.; MULVIHILL, E.E.; MURRAY, W.; HUFF, M.W. Citrus flavonoids and lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol* 2013; 24(1): 34-40.
- AYVAZ, G.; ÇIMEN, A.R. Methods for body composition analysis in adults. *Open Obes J* 2011; 3: 62-69.
- AZMAN, K.F.; AMOM, Z.; AZLAN, A.; ESA, N.M.; ALI, RM.; SHAH, Z.M.; *et al.* Antiobesity effect of *Tamarindus indica* L. pulp aqueous extract in high-fat diet-induced obese rats. *J Nat Med* 2012; 66(2): 333-342.
- AZOFEIFA, G.; QUESADA, S.; NAVARRO, L.; HIDALGO, O.; PORTET, K.; PÉREZ AM; *et al.* Hypoglycaemic, hypolipidaemic and antioxidant effects of blackberry beverage consumption in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Funct Foods* 2016; 26: 330-337.
- BALDISSERA, A.C.; DELLA BETTA, F.; PENNA, A.L.B.; LINDNER, J.D. Functional Foods: a new frontier for developing whey based protein beverages. *Semin Ciênc. Agrár* 2011; 32(4): 1497-1512.

BEZERRA, B. G.; DE MENEZES, DE S.L.; DOS S. A. S.; DE ALMEIDA, G.K.; SOUZA, M.T.; SANTOS, S.L.; APARECIDO, C. E.; DOS SANTOS, L.B.; DE SOUZA, A. A.A.; CARDOSO, J.C.; GOMES, S.V.; GOMES, M.Z.; DE ALBUQUERQUE, R.L. JÚNIOR. Hydroalcoholic extract of Brazilian red propolis exerts protective effects on acetic acid-induced ulcerative colitis in a rodent model. *Biomed Pharmacother* 2017; 85:687-696.

BARNES, M.J.; LAPANOWSKI, K.; CONLEY, A.; RAFOLS, J.A.; JEN, K.L.C.; DUNBAR, J.C. High fat feeding is associated with increased blood pressure, sympathetic nerve activity and hypothalamic mu opioid receptors, *Detroit, MI, USA. Brain Research Bull* 2003; 61(5): 511-519.

BERNARDIS, L.L.; PATTERSON, B.D. Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. *J Endocrinol* 1968; 40(4):527- 535.

Brasil. Ministério da Agricultura. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal – DIPOA. Instrução Normativa No 3, de 19 de Janeiro de 2001. Anexo VI - Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de propolis. Brasília: Ministério da Agricultura; 2001. D.O.U. de 23/01/2001. Seção I, 18-23.

BUENO-SILVA, B.; FRANCHIN, M.; ALVES, C.F.; DENNY, C.; COLÓN, D.F.; CUNHA, T.M.; ALENCAR, S.M.; NAPIMOGA, M.H.; ROSALEN, P.L. Main pathways of action of Brazilian red propolis on the modulation of neutrophils migration in the inflammatory process. *Phytomed* 2016; 23(13):1583-1590.

BUETTNER, R.; PARHOFER, K.G.; WOENCKHAUS, M.; WREDE, C.E.; KUNZ-SCHUGHART, L.A.; SCHOLMERICH, J.; BOLLHEIMER, L.C. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. *J Mol Endocrinol* 2006 (36), 485–501.

BURIOL, L.; FINGER, D.; SCHMIDT, E.M.; DOS SANTOS, J.M.T.; DA ROSA, M.R.; QUINÁIA, S.P.; *et al.* Composição química e atividade biológica de extrato oleoso de própolis: uma alternativa ao extrato etanólico. *Quím. Nova* 2009; 32(2): 296-302.

CANI, P.D.; POSSEMIERS, S.; VAN DE WIELE, T.; GUIOT, Y.; EVERARD, A.; ROTTIER, O.; *et al.* Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut* 2009; 58(8):1091-103.

CARBONE, F.; LA ROCCA, C.; MATARESE, G. Immunological functions of leptin and adiponectin. *Biochimie* 2012; 94(10): 2082-2088.

CHIOU, Y. S.; WU, J.C.; HUANG, Q.; SHAHIDI, F.; WANG, Y.J.; MIN-HSIUNG PAN, C.T. Metabolic and colonic microbiota transformation may enhance the bioactivities of dietary polyphenols. *Journal of Functional Foods* 2014; 7: 3-25.

CLEMENTE, M. D. G.; ABREU, L. R. DE; PINTO, S. M.; REZENDE, C. P. A. Perfil dos ácidos graxos de "manteigas de garrafa" produzidas na região de Salinas - Minas Gerais. *Ciênc Agrotec* 2009; 33 (6): 1615-1620.

CLEMENTE, M.G.; DE ABREU, L.R. Physical and chemical characterization and oxidative rancidity of bottled butter fat. *Ciênc agrotec* 2008; 32(2): 493-496.

COLINA-COCA, C.; GONZÁLEZ-PEÑA, D.; ANCOS, B.; SÁNCHEZ-MORENO, C.; Dietary onion ameliorates antioxidant defence, inflammatory response, and cardiovascular risk biomarkers in hypercholesterolemic Wistar rats. *J of F Foods* 2017; 36: 300-309.

- CONTI, R.M.C.; ZANETTI, M.A.; NETTO, A.S.; RODRIGUES, P.H.M.; PACHECO, J.C.G.; GARRINE, C.M.L.P.; YOSHIKAWA, C.Y.C. Efeitos de fontes orgânicas de cobre e enxofre sobre os parâmetros bioquímicos no soro de ovinos. *Pesq Vet Bras* 2015; 35(11): 875-881.
- DA SILVA, A.S.; PAULI, J.R.; ROPELLE, E.R.; OLIVEIRA, A.G.; CINTRA, D.E.; DE SOUZA, C.T.; VELLOSO, L.A.; CARVALHEIRA, J.B.; SAAD, M.J. Exercise intensity, inflammatory signaling, and insulin resistance in obese rats. *Med Sci Sports Exerc* 2010; 42(12):2180-2188.
- DA SILVA, R.O.; ANDRADE, V.M.; BULLÉ.; RÊGO, E.S.; AZEVEDO DÓRIA, G.A.; SANTOS LIMA, B.D.; DA SILVA, F.A.; *et al.* Acute and sub-acute oral toxicity of Brazilian red propolis in rats. *J Ethnopharmacol* 2015; 170: 66-71.
- DANTAS, J.A.; AMBIEL, C.R.; CUMAN, R.K.N.; BARONI, S.; BERSANI-AMADO, C.A. Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná. *Acta Scientiarum* 2006; 28(2):165-70.
- DAUGSCH, A.; MORAES, C.S.; FORT, P.; PARK, Y.K. Brazilian Red Propolis Chemical Composition and Botanical Origin. *Evid Based Complement Alternat Med* 2008; 5(4): 435-441.
- DE BOER, J.F.; KUIPERS, F.; GROEN, A.K. Cholesterol transport revisited: a new turbo mechanism to drive cholesterol excretion. *Trends Endocrinol Metab* 2018; 29(2):123-133.
- DEJI, N., KUME, S., ARAKI, S., SOUMURA, M., SUGIMOTO, T., ISSHIKI, K., CHINKANASAKI, M., SAKAGUCHI, M., KOYA, D., HANEDA, M., KASHIWAGI, A., UZU, T., Structural and functional changes in the kidneys of high-fat diet-induced obese mice. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 2009; 296: 118–126.
- DEON, R. G.; ROSAB, R. D. DA; ZANARDO, V. P. S.; CLOSS, V. E. Consumo de alimentos dos grupos que compõem a pirâmide alimentar americana por idosos brasileiros: uma revisão. *Ciência & Saúde* 2015; 8 (1): 26-34.
- DIAS, M. A.; CENEVIVA, R.; ELIAS JR., J.; ZUCOLOTO, S.; BALDO, C. F.; ÉVORA, P.R.B. Alterações histológicas, do fluxo portal e do óxido nítrico plasmático em ratos submetidos à obstrução/desobstrução biliar. *Acta Cir Bras* 2008; 23 (1): 1-7.
- DIRETRIZES BRASILEIRAS DE OBESIDADE. [online]. 2016 [acessado em 30 de abril de 2017]. Disponível em: <http://www.abeso.org.br/uploads/downloads/92/57fcc403e5da.pdf>.
- DUYNHOVEN, J. V.; VAUGHAN, E. E.; JACOBS, D. M.; KEMPERMAN, R. A.; EWOUT J. J.; ZEN, VAN VEL.; GROSS, G. Metabolic fate of polyphenols in the human superorganism. *PNAS* 2011; 108 (1): 4531-4538.
- ELISSA, L.A.; ELSHERBINY, N. M.; MAGMOMAH, A.O. Propolis restored adiponectin level in type 2 diabetes through PPAR γ activation, *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences* 2015; (2): 318-326.
- ESTADELLA, D.; OYMA, L.M.; DAMASO, A.R.; RIBEIRO, E.B.; NASCIMENTO, O.N. Effect of Palatable Hyperlipidic Diet on Lipid Metabolism of Sedentary and Exercised Rats. *Nutrition* 2004; (20): 218-224.
- FAO, IFAD, UNICEF, WFP and WHO. 2017. The State of Food Security and Nutrition in the World 2017. [online]. 2017. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-I7695e.pdf>.
- FIDÈLE, N.; BARAMA, J.; TALLA, E.; DIMO, T. Hypolipidemic, antioxidant and anti-atherosclerogenic effect of aqueous extract leaves of *Cassia. occidentalis* Linn (Caesalpinaceae) in diet-induced hypercholesterolemic rats. *BMC Complement Altern Med* 2017; 17(76): 1-11.
- FINKEL, T. Signal transduction by reactive oxygen species. *J Cell Biol* 2011; 194(1): 7-15.

- FIORENZANO, A.R.; RIESEMBERG, C.C.; FOLTRAN, L.; SCOTTI, R.I.; MORAES, S.A.G.; MANSO, F. C.; *et al.* Aspectos clínicos e farmacológicos da associação sinvastatina-ezetimiba. *Arq. Ciênc. Saúde Unipar* 2006; 10(3): 181-183.
- FONTANA, L.; WEISS, E. P.; VILLAREAL, D. T.; KLEIN, S.; HOLLOSZY, J. O. Long-term effects of calorie or protein restriction on serum IGF-1 and IGFBP-3 concentration in humans. *Aging Cell* 2008; 7 (5): 681-687.
- GAAL, L.F.; MERTENS, I.L.; DE BLOCK, C.E. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature* 2006; 444 (7121): 875-880.
- GODOY-MATOS, A.F.; CRUZ, I.C.; DA COSTA, R.; SILVA-JÚNIOR, W.S. Adipocinas: uma visão geral dos seus efeitos metabólicos. *Rev HUPE* 2014; 13(1): 54-60.
- GOMES, F.; TELO, D.F.; SOUZA, H. P.; NICOLAU, J. C.; HALPERN, A.; SERRANO JR, C.V. Obesidade e doença arterial coronariana: papel da inflamação vascular. *Arq. Bras. Cardiol* 2010; 94 (2): 273-279.
- GUEDES, A.M., CABRITA, A., PINHO, A.T., SILVA, A.P., LOPES, A., SANTOS, V., NEVES, P.L. O risco renal da obesidade. *Acta Médica Portuguesa* 2010; (23): 853- 858.
- GUERRA, R.L.F.; PRADO, W.L.; CHEIK, N.C.; VIANNA, F.P.; BOTERO, J.P.; VENDRAMINI, R.C.; CARLOS, I.Z.; ROSSI, E.A.; DAMASCO, A.R. Effects of 2 or 5 consecutive exercise days on adipocyte area and lipid parameters in Wistar rats, São Paulo, Brazil. *Lipids Health Dis* 2007; 6 (16): 1-8.
- HALIMA, B.H.; SONIA, G.; SARRA, K.; HOUDA, B.J.; FETHI, B.S.; ABDALLAH, A. Apple Cider Vinegar Attenuates Oxidative Stress and Reduces the Risk of Obesity in High-Fat-Fed Male Wistar Rats. *J Med Food* 2018; 21(1):70-80.
- HE, J.; GIUSTI, M.M. Anthocyanins: Natural Colorants with Health-Promoting Properties. *Annu. Rev Food Sci Technol* 2010; 1:163–187.
- HOSTE, H.; DE-MARTINEZ, C.M.O.; MANOLARAKI, F.; BRUNET, S.; OJEDA-ROBERTOS, N.; FOURQUAUX, I.F.J.; TORRES-ACOSTA, C. A.; SANDOVAL, C. Direct and indirect effects of bioactive tannin-rich tropical and temperate legumes against nematode infections. *Vet Parasitol*; 2012; 186: 18-27.
- HUGHES, A.R.; SHERRIFF, A.; LAWLOR, D.A.; NESS, A.R.; REILLY, J.J. Incidence of obesity during childhood and adolescence in a large contemporary cohort. *Prev Med* 2011; 52(5): 300-304.
- IBARS, M; ARDID-RUIZ, A.; SUÁREZ, M.; MUGUERZA, B.; BLADÉ, C.; ARAGONÈS, G. Proanthocyanidins potentiate hypothalamic leptin/STAT3 signalling and Pomc gene expression in rats with diet-induced obesity. *Int J Obes (Lond)* 2016; 41(1): 129–136.
- IBGE 2009. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009. Epiinfo [online]. 2011 [acessado em 22 de janeiro]. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv50063.pdf>.
- IGEL, L.I.; KUMAR, R.B.; SAUNDERS, K.H.; ARONNE, L.J. Practical Use of Pharmacotherapy for Obesity. *Gastroenterology* 2017; 152(7):1765-1779.
- IYER A.; KAUTER, K.; ALAM, M.A.; HWANG, S.H.; MORISSEAU, C.; HAMMOCK, B.D.; *et al.* Pharmacological inhibition of soluble epoxide hydrolase ameliorates diet-induced metabolic syndrome in rats. *Exp Diabetes Res* 2012; 1-11.
- KAMBHAM, N., MARKOWITZ, G.S., VALERI, A.M., LIN, J., D'AGATI, V.D., "Obesity related glomerulopathy: an emerging epidemic". *Kidney International* 2001; 59(4):1498 –1509.
- KAUME, L.; HOWARD, L.R.; DEVAREDDY, L. The blackberry fruit: a review on its composition and chemistry, metabolism and bioavailability, and health benefits. *J Agric Food Chem* 2012; 60(23): 5716-5727.

- KAUP, S.R.; ARUNKUMAR, N.; BERNHARDT, L.K.; VASAVI, R.G.; SHETTY, S.S.; PAI, S.R.; ARUNKUMAR, B. Anti hyperlipidemic activity of *Cynodon Dactylon* extract in high-cholesterol diet fed Wistar rats. *Genomic Medicine, Biomarkers, and Health, Sciences* 2011;(3): 98-102.
- KEITH, J.N. Pharmacotherapy in Treatment of Obesity. *Gastroenterol Clin North Am* 2016; 45(4): 663-672.
- KERSSHAW, E.E.; FLIER, J.S. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(6): 2548-56.
- KESH, S.B.; SIKDER K.; MANNA, K.; DAS, D.K.; KHAN, A.; DAS, N.; *et al.* Promising role of ferulic acid, atorva statin and their combination in ameliorating high fat diet-induced stress in mice. *Life Sci* 2013; 92(17-19):938-949.
- KOYA-MIYATA, S.; ARAI, N.; MIZOTE, A.; TANIGUCHI, Y.; USHIO, S.; IWAKI, K.; *et al.* Propolis prevents diet-induced hyperlipidemia and mitigates weight gain in diet-induced obesity in mice. *Biol Pharm Bull* 2009; 32 (12): 2022-2028.
- KRITCHEVSKY, S.B.; BEAVERS, K.M.; MILLER, M.E.; SHEA, M.K.; HOUSTON, D.K.; KITZMAN, D.W.; *et al.* Intentional weight loss and all-cause mortality: a meta-analysis of randomized clinical trials. *PLoS One* 2015; 10(3):e0121993.
- LESSER, I.A.; YEW, A.C.; MACKEY, D.C.; LEAR, S.A. A cross-sectional analysis of the association between physical activity and visceral adipose tissue accumulation in a multiethnic cohort. *Int J Obes (Lond)* 2012;1-8.
- LIMA, A.C.R.; OLIVEIRA, A.B. Fatores psicológicos da obesidade e alguns apontamentos sobre a terapia cognitivo-comportamental. *Mud Psic Saúde* 2016; 24(1): 1-14.
- LIMA, C.M.; LIMA, A.K.; MELO, M.G.D.; DÓRIA, G.A.A.; LEITE, B.L.S.; SERAFINI, M.R.; ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R.L.C.; ARAÚJO, A.A.S. Valores de referência hematológica e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes, Sergipe- Brasil. *Scientia Plena* 2014;(10): 1-9.
- LIMA, V. L. A. G. de; MELO, E. d. Al.; LIMA, L. d. S. ; LIMA, D. E. d. S. Polpa congelada de acerola: efeito da temperatura sobre os teores de antocianinas e flavonóis totais. *Rev Bras Frutic* 2002; 24(3): 669-670.
- LIMA-CAVENDISH, R.L.; SANTOS, J. de S.; NETO, R.B.; PAIXÃO, A.O.; OLIVEIRA, J.V.; ARAÚJO, E.D.de. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Brazilian red propolis extract and formononetin in rodents. *Jour of Ethnopharmacol* 2015; 173: 127–133.
- LIN, C.T, KANG L. Adipose extracellular matrix remodelling in obesity and insulin resistance. *Biochem Pharmacol* 2016. 119:8-16.
- LIO, A. ; OHGUCHIA, K.; INOUEB, H.; MARUYAMAC, H.; ARAKIC, Y.; NOZAWA, Y.; ITO, M.; Ethanol extracts of Brazilian red propolis promote adipocyte differentiation through PPAR- γ activation. *Phytomedicine* 2010. 17: 974–979.
- LIU, Y.; HEYING, E.; TANUMIHARDJO, S,A.; History, Global Distribution, and Nutritional Importance of Citrus Fruits. *Compr Rev Food Sci F* 2012; 11: 530-545.
- MACHADO, B.A.; SILVA, R.P.; BARRETO, G. DE A.; COSTA, S.S.; SILVA, D.F.; BRANDÃO, H.N.; ROCHA, J.L.; DELLAGOSTIN, O.A.; HENRIQUES, J.A.; UMSZAGUEZ, M.A.; PADILHA, F.F. Chemical Composition and Biological Activity of Extracts Obtained by Supercritical Extraction and Ethanol Extraction of Brown, Green and Red Propolis Derived from Different Geographic Regions in Brazil. *PLoS One* 2016; 11(1): 1-26.

- MADDOX, D.A.; ALAVI, F.K.; SANTELLA, R.N.; ZAWADA, JR., E.T., Prevention of obesity-linked renal disease: Age-dependent effects of dietary food restriction. *Kidney International* 2002; 62: 208-219.
- MALAFAIA, A.B.; NASSIF, P.A.N.; RIBAS, C.A.P.M.; ARIEDE, B.L.; SUE, K.N.; CRUZ, M.A. Indução de obesidade com sacarose em ratos. *ABCD Arq. Bras. Cir. Dig* 2013; 26(1): 17-21.
- MANCINO, L.; KUCHLER, F. Offsetting behavior in reducing high cholesterol: substitution of medication for diet and lifestyle changes. *J of Choice Model* 2009; 2(1): 51-64.
- MAYWORM MAS, LIMA CA, TOMBA ACB, CAROLINE C. FERNANDES-SILVA CC, SALATINO MLF, SALATINO A. Does propolis contain tannins? *Evid Compl and Alt Med* 2014, 2014: 1-4.
- MELO, M.G.D.; DÓRIA, G.A.A.; SERAFINI, M.R.; ARAÚJO, A.A.S. Valores de referência Hematológicos e Bioquímicos de Ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe, Sergipe – Brasil. *Scientia Plena* 2012; 4(8): 1-6.
- MENDONÇA L.S; MENDONÇA F.M; ARAÚJO Y.L, ARAÚJO E.D, RAMALHO S.A., NARAIN, N. Chemical markers and antifungal activity of red propolis from et al; Sergipe, Brazil. *Food Science and Technology* 2015; 35 (2): 291-298.
- MENEGASSI, B.; DE OLIVEIRA, M.C.; KÜHL, A.M.; VICENTE, M.A.; SALDAN, P.C. Conhecimentos sobre fontes alimentares de colesterol entre usuários de uma clínica escola de nutrição. *R BONE* 2017; 11(66): 459-468.
- MILANE, L.C.; JORDÃO, Í.S.C. Utilização de fibras no tratamento dietoterápico da Síndrome Metabólica. *R BONE* 2012; 2(12): 539-546.
- MONTEIRO, W.L.A.; ROSA, G.; LUIZ, R.G.; NETO, J.F.N.; OLIVEIRA, G.M.M.; Efeitos de Diferentes Tipos de Linhaça nas Sensações de Apetite e Saciedade no Sobrepeso e na Obesidade. *InterJ Cardiac Sciences* 2016; 29 (1):37-46.
- MOYANO, G.; SÁYAGO-AYERDI; S.G.; LARGO C.; CAZ, VICTOR; SANTA MARIA, M.; TABERNERO, M. Potential use of dietary fibre from *Hibiscus sabdariffa* and *Agave tequilana* in obesity management. *J Funct Foods* 2016; 21, 1–9.
- MUSSO, G.; GAMBINO, R.; CASSADER, M. Obesity, Diabetes, and Gut Microbiota The hygiene hypothesis expanded? *Diabetes Care* 2010; 33(10): 2277–2284.
- NOVELLI, E.L.; DINIZ, Y.S.; GALHARDI, C.M.; EBAID, G.M.; RODRIGUES, H.G.; MANI, F.; FERNANDES, A.A.; CICOGNA, A.C.; NOVELLI, FILHO. J.L. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Lab Anim* 2007; 41(1): 111-120.
- OLIVEIRA, I. R.; DO NASCIMENTO, P. G. G. Estudo Químico e Avaliação Biológica da Própolis Vermelha de Alagoas, *Rev. Virtual Quim* 2018; (10): 1-11.
- OLIVEIRA, I. R.; DO NASCIMENTO, P. G. G. Estudo Químico e Avaliação Biológica da Própolis Vermelha de Alagoas, *Rev. Virtual Quim* 2018; (10): 1-11.
- OLIVEIRA, T.K.B.; ALMEIDA, F.A.C.; FALCÃO, M.P.M.M.; LEMOS-JORDÃO, A.J.J.M.; RAMOS, K.R.L.O.; SILVA, J.F. Análise do extrato aquoso de *Arachis hypogaea* L. no combate à dislipidemia e ao ganho ponderal de ratos Wistar submetidos à dieta hiperlipídica. *Pesq Vet Bras* 2016; 36(11): 1121-1126.
- PANEE, J. Monocyte chemo attractant protein 1 (mcp-1) in obesity and diabetes. *Cytokine* 2012; 60(1): 1-12.
- PANICKAR, KS. Effects of dietary polyphenols on neuroregulatory factors and pathways that mediate food intake and energy regulation in obesity. *Mol Nutr Food Res* 2013; 57(1): 34-47.

- PAPAFRAGKAKI, D., TOLIS, G., Obesity and renal disease: A possible role of leptin. *Hormones* 2005;4(2):90-95.
- PARKER, E.D.; FOLSOM, A.R. Intentional weight loss and incidence of obesity related cancers: the Iowa Women's Health Study. *Int Obs J* 2003; 27:1447-1452.
- PASSOS, J.P.G.; AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO ASSOCIADO À QUITOSANA EM RATOS HIPERLIPIDÊMICOS. [Dissertação]. Aracaju: Universidade Tiradentes, 2010.
- PEREIRA, L.O.; FRANCISCHI, R.P.; LANCHÁ-JUNIOR, A.H. Obesidade: Hábitos Nutricionais, Sedentarismo e Resistência à Insulina. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2003; (47) 111-127.
- PINHEIRO, S.K.; RIBEIRO, D.R.; ALVES, A.V.F.; PEREIRA-FILHO, R.N.; OLIVEIRA, C.R.; LIMA, S.O.; *et al.* Modulatory activity of brazilian red propolis on chemically induced dermal carcinogenesis. *Acta Cirúrgica Brasileira* 2014; 29(2): 111-117.
- PIRES, A.; CASTELA, E.; SENA, C.; SEIÇA, R. Obesidade: paradigma da disfunção endotelial em idade pediátrica. *Acta Med Port* 2015; 28(2):233-239.
- POMPLUN, D.; VOIGT, A.; SCHULZ, T.J.; THIERBACH, R.; PFEIFFER, A.F.; RISTOW, M. Reduced expression of mitochondrial frataxin in mice exacerbates diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; (104): 6377-6381.
- PRADO, W.L.; LOFRANO, M.C.; OYAMA, L.M.; DÂMASO, A.R. Obesidade e Adipocinas Inflamatórias: Implicações Práticas para a Prescrição de Exercício. *Rev Bras de Med do Esporte* 2009; (15): 378-383.
- PRIOR, R.L.; XIANLI, W.U.; GU, L.; HAGER, T.J.; HAGER, A.; HOWARD, L.R. Whole berries versus berry anthocyanins: interaction with dietary fat levels in the c57bl/6j mouse model of obesity. *J Agric Food Chem* 2008;(56):647-653.
- QUARESMA, A.B.; D'ACAMPORA, A.J.; TRAMONTE, R.; FARIAS, D.C.; JOLY, F.S. Histological study of the liver and biochemistry of the blood of Wistar rats following ligation of right hepatic duct. *Acta Cir Bras* 2007;22(1):68-78.
- QUEIROZ, K. C.; ALFENAS, R. DE C. G.; SILVA, I. N. Hábitos alimentares e perfil de ingestão
- RAMÍREZ, N.M.; TOLEDO, R.C.L.; MOREIRA, M.E.C.; MARTINO, H.S.D.; BENJAMIN, L.A.; QUEIROZ, J.H.; *et al.* Anti-obesity effects of tea from *Mangifera indica* L. leaves of the Ubá variety in high-fat diet-induced obese rats. *Biomed & Pharmacother* 2017;91: 938-945.
- RASHID, S.; GENEST, J. Effect of Obesity on High-density Lipoprotein Metabolism.
- RASOULI, N.; KERN, P.A. Adipocytokines and the metabolic complications of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93:64-73.
- ROCHA, D.A.; ABREU, C.M.P.; SOUSA, R.V.; CORRÊA, A.D. ;FONSECA, E.W.N. Avaliação preliminar *in vivo* do efeito hipocolesterolêmico do polvilho da fruta-de-lobo (*Solanum lycocarpum* A. St.-Hil.). *Rev bras Plantas* 2012; 14 (2): 361-369.
- ROCHA, E.M.; SILVA, M.M.S.; GOMES, M.P.C.; MARINHO, T.M.R.T.; SILVA, J.V.L. Relato de experiências do grupo de apoio aos pacientes obesos atendidos na clínica escola de nutrição. *Entre Aberta Revista de Extensão* 2014; 91(1): 1-12.
- ROSINI, T.C.; SILVA, A.S.R.; MORAES, C. Obesidade induzida por consumo de dieta: modelo em roedores para o estudo dos distúrbios relacionados com a obesidade. *Rev Assoc Med Bras* 2012; 58(3):383-387.

- SALDANHA, T.; MASALI, M.R.; BRAGAGNOLO, N. Avaliação comparativa entre dois métodos para a determinação do colesterol em carne e leite. *Ciênc tecnol Aliment* 2004; 109-113.
- SAMOUT, N.; ETTAYA, A.; BOUZENNA, H.; NCIB, S.; ELFEKI, A.; HFAIEDH, N. Beneficial effects of *Planta go albicans* on high-fat diet-induced obesity in rats. *Biomed Pharmacother* 2016; 18: 1768-1775.
- SIASOS, G.; TOUSOULIS, D.; OIKONOMOU, E.; ZAROMITIDOU, M.; STEFANADIS, C.; PAPAVALASSILOU, AG. Inflammatory markers in hyperlipidemia: from experimental models to clinical practice. *Curr Pharm Des* 2011; 17(37):4132-46.
- SILVA, B.B.; ROSALEN, P.L.; CURY, J.A.; IKEGAKI, M.; SOUZA, V.C.; ESTEVES, A.; *et al.* Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of brazilian propolis. *Evid Based Complement Alternat Med* 2008; 5(3): 313-316.
- SIQUEIRA, A.L.; DANTAS, C.G.; GOMES, M.Z.; PADILHA, F.F.; ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R.L.C.; CARDOSO, J.C. Estudo da ação antibacteriana do extrato hidroalcoólico de propolis vermelha sobre *Enterococcus faecalis*, Sergipe-Brasil. *Rev Odontol UNESP* 2014; 43(6): 359-366.
- SLENTZ, C.A.; TANNER, C.J.; BATEMAN, L.A.; MICHAEL, T. D. M.T.; HUFFMAN, K.M.; HOUMARD, J.A.; *et al.* Effects of Exercise Training Intensity on Pancreatic-Cell Function. *DIABETES CARE* 2009; 32(10): 1807-1811.
- SOUZA, D.R.DE.; ANJOS, L. A. D.; WAHRLICH, V.; VASCONCELLOS, M. T. L.; MACHADO, J.M.M. Ingestão alimentar e balanço energético da população adulta de Niterói, Rio de Janeiro, Brasil: resultados da *Pesquisa de Nutrição, Atividade Física e Saúde* (PNAFS). *Cad Saúde Pública* 2010; 26 (5): 879-890.
- SOUZA, E. B. DE. Transição nutricional no Brasil: análise dos principais fatores. *Cadernos UNIFOA* 2010; 5 (13): 49-53.
- SOUZA, F. DE.; MARCHESIN, J.B.I.; CAMPOS, A. C. L.; MALAFAIA, O.; MONTEIRO, O.G. Efeito da vagotomia troncular em ratos injetados na fase neonatal com glutamato monossódico: estudo biométrico. *Acta Cir Bras* 2001; 16(1).
- SOUZA, N.H.C.; FERRARI, R.A.M.; SILVA, D.F.T.; NUNES, F.D.; BUSSADORI, S.K.; FERNANDES, K.P.S. Effect of low-level laser therapy on the modulation of the mitochondrial activity of macrophages. *Braz J Phys Ther* 2014; 18(4):308-314.
- SWEETING, H.N. Measurement and Definitions of Obesity In Childhood and Adolescence: A field guide for the uninitiated. *Nutri J* 2007; 6 (32): 1-8.
- SWINBURN, B.A.; CATERSON, I.; SEIDELL, J.C.; JAMES, W.P.T. Diet, nutrition and the prevention of excess weight gain and Obesity. *Public Health Nutr* (2004);7(1A): 123-146.
- TABERNERO M.; SARRIA B.; CARLOTA LARGO C.; MARTINEZ-LOPEZ S.; MADRONA A.; ESPARTERO J.L.; BRAVO L.; MATEOS R. Comparative evaluation of the metabolic effects of hydroxytyrosol and its lipophilic derivatives (hydroxytyrosyl acetate and ethyl hydroxytyrosylether) in hypercholesterolemic rats. *Food Func*; 2014, 5 (7): 1556.
- TAKASHIBA, K. S.; SEGATELLI, T. M.; DE MORAES, S. M. F.; NATALI, N.R.M. Morfologia testicular de ratos Wistar obesos sedentários e submetidos a treinamento físico. *Acta Scientiarum Health Sciences*; 2011 33 (1): 25-33.
- TALBOT, C. P.J.; PLAT, J.; RITSCH, A.; MENSINK, R. P. Determinants of cholesterol efflux capacity in humans. *Progress in Lipid Research* 2018; 69: 21–32.

- TAVARES, V.; HIRATA, M. H.; HIRATA, R. D. C. Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR γ): estudo molecular na homeostase da glicose, metabolismo de lipídeos e abordagem terapêutica. *Arq Bras Endocrinol Metab* ; 51(4): 526-533.
- THURSBY, E.; JUGE, N. Introduction to the human gut microbiota. *Biochem J* 2017; 16;474(11):1823-1836.
- TRAYHURN, P.; WANG B, WOOD IS. Hypoxia in adipose tissue: a basis for the dysregulation of tissue function in obesity. *Br J Nutr* 2008; 100(2): 227-35.
- TSAO, R.; ZHANG, H.; Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects, *Curr Opin Food Sci* 2016, 8: 33-42.
- VARGAS, E. J.; RIZK, M.; Bazerbachi, Fateh.; Dayyeh, B. K. A. Medical devices for obesity treatment endoscopic bariatric therapies. *Med Clin N Am* 2018; 102: 149 -163.
- VASQUES, A. C. J.; PEREIRA, P. F.; GOMIDE, R. M.; BATISTA, M. C. R.; CAMPOS, M. T. F.S. SANT'ANA, L.F.R. Influência do excesso de peso corporal e da adiposidade central na glicemia e no perfil lipídico de pacientes portadores de diabetes mellitus tipo 2. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2007;51(9):1516-1521.
- VATANSEVER, HS., SARKUN, K., GURHAN., SID., OZDAL-KURT, F., TURKOZ, E., GENÇAY, O., SALIH, B.; Propolis from turkey induces apoptosis through activating caspases in human breast carcinoma cell lines. *Acta Histochem* 2010; 112(6):546-556.
- VÁZQUEZ, R.A.F. *Relaciones de la grasa visceral y de tronco con el síndrome metabólico*. [Tese]. Málaga: Universidad de Málaga, 2016.
- VIANA, L. V.; DE PAULA, T. P.; LEITÃO, C. B.; AZEVEDO, M. J. Fatores determinantes de perda de peso em adultos submetidos a intervenções dietoterápicas. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2013; 57(9): 717-721.
- VIGITEL 2016. Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. [online]. 2016. Disponível em: http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/junho/07/vigitel_2016_jun17.pdf
- VILLARROYA, J.; GIRALT, M.; VILLARROYA, F. Mitochondrial DNA: An Up-and-coming Actor in White Adipose Tissue Pathophysiology. *Obesity* 2009;(17):1814–1820.
- WEBB, VICTORIA L.; WADDEN, THOMAS A.; Intensive lifestyle intervention for obesity: principles, practices, and results. *Gastroenterol* 2017 ;152(7):1752-1764. 10.
- WEI, S.; LIN, I.; LIAO, M.; ZHOU, H.; LI, Y.; Characterization and antioxidative properties of condensed tannins from the mangrove plant *Aegiceras corniculatum*. *J Appl Polym Sci* 2011, 124: 2463-2472.
- WHITE, P.A.S.; CERCATO, L.M.; ARAÚJO, J.M.D.; SOUZA, L.A.; SOARES, A.F.; BARBOSA, A.P.O.; NETO, J.M.R.; MARÇAL, A.C.; MACHADO, U.F.; CAMARGO, E.A.; SANTOS, M.R.V.; BRITO, L.C. Modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica e associada à resistência à ação da insulina e intolerância à glicose, Sergipe, Brasil. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2013; 5(57): 339-345.
- WHO. Obesity and overweight [página internet]. World Health Organization. 2016. Disponível em: http://www.who.int/hpr/NPH/docs/gs_obesity.pdf. Acesso em: 15 de março de 2017.
- WIT, L.; M, F.; STRATEN, A.; LAMERS.; Depressive and anxiety disorders and the association with obesity, physical, and social activities. *Depress anxiety* 2010, 27: 1057-1065.
- WU, Y., LIU, Z., XIANG, Z., ZENG, C., CHEN, Z., MA, X., LI, L., Obesity-related glomerulopathy: Insights from gene expression profiles of the glomeruli derived from renal biopsy samples. *Endocrinology* 2006; 147(1) :44-50.

XU, Z., LANTING, L., VAZIRI, N.D., LI, Z., SEPASSI, L., RODRIGUEZ-ITURBE, B., NATARAJAN, R., Upregulation of angiotensin II type 1 receptor, inflammatory mediators, and enzymes of arachidonate metabolism in obese Zucker rat kidney reversal by angiotensin II type 1 receptor blockade. *Circulation* 2005; 111: 1962-1969.

YANOVSKI S.; YANOVSKI J.; Long-term Drug Treatment for Obesity: A Systematic and Clinical Review, *JAMA* 2014, 311(1): 74-86.

ANEXO



UNIVERSIDADE TIRADENTES
DIRETORIA DE PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO ANIMAL - CEUA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DA CEUA

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito do tratamento para obesidade com Extrato Hidroalcoólico de Própolis Vermelha em Ratos", registrada com o nº 010117R, sob a responsabilidade de Ricardo Luiz C. de Albuquerque Júnior, que envolve a utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, Subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE TIRADENTES, em reunião de 22/02/2017.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa
Vigência da autorização	06/03/2017 a 28/11/2017
Espécie/linhagem/raça	<i>Rattus norvegicus</i> /Wistar
Nº de Animais	28
Peso/idade	200 a 250 g / 1 a 2 meses
Sexo	Machos
Origem	Biotério da UNIT

Aracaju, 22 de outubro de 2017

Maria Júlia Nardelli
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso Animal - CEUA
Universidade Tiradentes - UNIT