

JOSELITO NARDY RIBEIRO

EFEITOS DE PRÓPOLIS, ANTOCIANINA E NARINGENINA EM COELHOS  
NORMAIS E DIABÉTICOS

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2001

JOSELITO NARDY RIBEIRO

EFEITOS DE PRÓPOLIS, ANTOCIANINA E NARINGENINA EM COELHOS  
NORMAIS E DIABÉTICOS

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 5 de fevereiro de 2001.

---

Prof. Tanus Jorge Nagem  
(Conselheiro)

---

Prof<sup>a</sup> Maria Cristina Baracat Pereira

---

Prof. Dejair Message

---

Prof<sup>a</sup> Márcia Rogéria de Almeida

---

Prof<sup>a</sup> Tânia Toledo de Oliveira  
(Orientadora)

À minha esposa Araceli.

## AGRADECIMENTO

Aos verdadeiros cientistas, por trabalharem incansavelmente na construção de um mundo melhor. Não há missão mais fantástica do que a de desvendar os mistérios deste maravilhoso universo.

Ao meu falecido pai, por me permitir vir a este mundo e contemplar suas maravilhas; queria ter tido mais tempo para nos conhecermos melhor – Sinto muita saudade.

À minha mãe, por me ensinar a compreender melhor meu próximo e por mostrar que a verdade está acima de tudo.

Ao meu sogro Carlos Flores, por ser muito mais que um sogro, um verdadeiro pai, por seus conselhos, que foram e sempre serão preciosos para mim.

Ao meu cunhado Pablo Ariel, por sua amizade e leveza de espírito, que muito engrandecem a minha alma.

Ao Pepe e à Abuela Mariana, pela grande amizade e pelo respeito.

Aos meus cunhados Leonardo e Melina, pelo carinho.

Aos meus grandes amigos Flávio e Dula, pela grande amizade, pelo carinho e pelo respeito.

Ao pequenino Tales, por me mostrar que a infância é algo que não deve morrer nunca e por me proporcionar momentos de poesia que me fazem voltar a ser criança.

Aos meus amigos do Laboratório de Biofármacos Anderson, Felipe Zeymer, Renata, José Geraldo, Sabine, Cíntia, Rosimar, Vanessa, Fabiana, Manuela, Wiliam, Carolina, Lívia, Elizabete, Elisângela, Eliana, Natércia, Leonardo, Renato, Manuela, Júnia, Lincon, Letícia, Fabrício, Carlos Eduardo e Flávia Murta, pelo companheirismo e pelas valorosas contribuições, sem os quais este trabalho jamais teria sido concluído.

Aos meus amigos e estudantes de Medicina Veterinária Alexandre e Graciela, pela inestimável ajuda.

Aos meus amigos Pedro, Anízio, Alex, Clodoaldo, Antonio, Fernando, Anel, Flávio, Madson, Lourdes, Karine, Maria Eliana e Antonio Augusto, pela amizade e pelo companheirismo na trilha deste caminho.

À professora Tânia Toledo de Oliveira, por acreditar em meu trabalho, por enxergar meus esforços e por me permitir fazer parte de sua equipe; sua ajuda foi muito valiosa para mim.

Ao professor Tanus Jorge Nagem, pela orientação, pela amizade, pelo respeito e pelas valiosas sugestões, que ajudaram a enriquecer este trabalho.

À professora Maria Goreti de Almeida Oliveira, por ser minha conselheira e pelos valiosos ensinamentos de enzimologia, que contribuíram enormemente para a minha formação neste Programa de Pós-Graduação.

Ao professor Dejair Message, pelas contribuições que têm dado ao Laboratório de Biofármacos.

À professora Maria Cristina Baracat Pereira, pela disponibilidade.

À professora Márcia Rogéria de Almeida, pelo tempo cedido.

À Industria de Alimentos Christian Hansen, por ceder a antocianina e a naringenina.

Ao Setor de Cunicultura da Universidade Federal de Viçosa (UFV), pelo fornecimento dos animais.

À Solange Starling Brandão, pela amizade e pelas valorosas contribuições no decorrer desta caminhada.

À UFV, pela minha formação – Esta casa irá me deixar saudades.

À CAPES, pela bolsa de estudo, que me permitiu realizar o Programa de Pós-Graduação.

À Claudia Serreti, pela amizade e pelos ensinamentos, que muito contribuíram para a minha formação profissional.

Às minhas irmãs Antonella e Josielle, pelo incentivo, pela amizade e pelo companheirismo.

Aos animais que fizeram parte desta pesquisa, por terem doado suas preciosas vidas.

Ao Adomar de Jesus Carvalho e à CONAP, pelo fornecimento da própolis.

Ao Eduardo, da Secretaria do Departamento de Bioquímica, pela inestimável ajuda.

Ao doutor Antônio Cândido, pelos valorosos conselhos.

Ao meu cunhado Olavo, pela grande amizade.

À minha sogra, pelo companheirismo.

À minha esposa, que se tornou a eterna luz do meu caminho, que me faz enxergar todos os dias o valor do verdadeiro amor, pelos dias e noites de intensa dedicação e encorajamento, pelos sábios conselhos, pelos preciosos ensinamentos e, sobretudo, por fazer minha vida valer a pena. Esta etapa é apenas mais uma das milhares que transporemos juntos.

## **BIOGRAFIA**

JOSELITO NARDY RIBEIRO nasceu na Cidade de Ponte Nova, Estado de Minas Gerais, no dia 6 de julho de 1972.

Concluiu o primeiro grau na Escola Estadual Senador Levindo Coelho, na Cidade de São Pedro dos Ferros, em Minas Gerais.

Em 1993, concluiu o segundo grau científico na Escola Estadual Effie Rolfs, em Viçosa, MG.

Em 1994, ingressou no Curso de Química da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, bacharelando-se em 1998.

Em 1999, iniciou o Programa de Pós-Graduação, em nível de Mestrado, em Agroquímica na UFV, submetendo-se à defesa de tese em fevereiro de 2001.

Nesse mesmo ano, foi aceito para o Doutorado em Biologia Funcional e Molecular na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), em Campinas, SP.

## ÍNDICE

	Página
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. A diabete.....	4
2.1.1. Histórico.....	4
2.1.2. A diabete no mundo atual.....	5
2.1.3. Características gerais da diabete.....	5
2.1.4. O pâncreas.....	7
2.1.5. A insulina.....	8
2.1.6. A diabete e a elevação plasmática dos triacilgliceróis.....	9
2.1.7. A indução de diabete em cobaias pela droga aloxano.....	9
2.2. Os flavonóides.....	10
2.2.1. As classes e a estrutura química dos flavonóides.....	11
2.2.2. As antocianinas.....	12
2.2.3. A naringenina.....	12
2.2.4. O metabolismo dos flavonóides em animais.....	12
2.2.5. O metabolismo dos flavonóides em humanos.....	13
2.2.6. Os flavonóides e suas propriedades farmacológicas.....	14

	Página
2.2.7. A toxicologia dos flavonóides.....	17
2.3. A própolis.....	18
2.3.1. Os constituintes da própolis.....	19
2.3.2. A própolis e seus fins terapêuticos.....	20
2.3.3. A toxicidade da própolis.....	21
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1. Etapas do experimento.....	23
3.2. Primeiro ensaio biológico.....	24
3.2.1. Período de adaptação dos animais.....	24
3.2.2. Primeiro dia de experimento e medida de peso corporal.....	25
3.2.3. Primeira quantificação de triacilgliceróis e glicose.....	25
3.2.3.1. Dosagem de triacilgliceróis.....	25
3.2.3.2. Dosagem de glicose.....	26
3.2.4. Indução de diabetes pela droga aloxano.....	26
3.2.5. Aplicação de glicose 50% para evitar a hipoglicemia.....	27
3.2.6. Segunda pesagem e exame de sangue.....	27
3.2.7. Separação dos grupos para tratamentos.....	28
3.3. Segundo ensaio biológico.....	28
3.4. Terceiro ensaio biológico.....	29
3.4.1. Dosagem de triacilgliceróis e glicose.....	31
3.4.2. Dosagem de colesterol total.....	31
3.4.3. Dosagem de colesterol-HDL.....	31
3.4.4. Dosagem de colesterol-LDL.....	32
3.4.5. Dosagem de proteína total.....	32
3.4.6. Dosagem de cálcio.....	33
3.4.7. Dosagem da transaminase glutâmico pirúvico (TGP).....	33
3.4.8. Dosagem da transaminase glutâmico oxalacético (TGO).....	33
3.4.9. Dosagem de fósforo.....	34
3.4.10. Dosagem da gama-glutamil transferase (gama-GT).....	34
3.4.11. Dosagem de cloretos.....	35
3.4.12. Dosagem de albumina.....	35
3.5. Tratamentos estatísticos dos dados obtidos.....	35

	Página
3.5.1. Primeiro ensaio biológico.....	35
3.5.2. Segundo ensaio biológico.....	36
3.5.3. Terceiro ensaio biológico.....	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
4.1. Primeiro ensaio biológico.....	38
4.1.1. Efeitos das substâncias -teste no peso corporal.....	38
4.1.2. Efeitos das substâncias -teste no teor de glicose.....	41
4.1.3. Efeitos das substâncias -teste no teor de triacilgliceróis.....	46
4.2. Segundo ensaio biológico.....	52
4.2.1. Efeitos das substâncias -teste no peso corporal.....	52
4.2.2. Efeitos das substâncias -teste no teor de glicose.....	56
4.2.3. Efeitos das substâncias -teste no teor de triacilgliceróis.....	59
4.3. Terceiro ensaio biológico (ensaio toxicológico).....	64
4.3.1. Efeitos das substâncias -teste no peso corporal.....	66
4.3.2. Efeitos das substâncias -teste no teor de glicose.....	66
4.3.3. Efeitos das substâncias -teste no teor de colesterol total.....	69
4.3.4. Efeitos das substâncias -teste no teor de colesterol-HDL.....	71
4.3.5. Efeitos das substâncias -teste no teor de colesterol-LDL.....	73
4.3.6. Efeitos das substâncias -teste no teor de triacilgliceróis.....	75
4.3.7. Efeitos das substâncias -teste no teor de proteína total.....	77
4.3.8. Efeitos das substâncias -teste no teor de albumina.....	80
4.3.9. Efeitos das substâncias -teste na atividade de gama- glutamil transferase (Gama-GT).....	83
4.3.10. Efeitos das substâncias -teste na atividade de transaminase glutâmico oxalacético (YGO).....	85
4.3.11. Efeitos das substâncias -teste na atividade da transaminase glutâmico pirúvico (TGP).....	87
4.3.12. Efeitos das substâncias -teste no teor de fósforo.....	90
4.3.13. Efeitos das substâncias -teste no teor de cloretos.....	92
4.3.14. Efeitos das substâncias -teste no teor de cálcio.....	94
5. RESUMO E CONCLUSÕES.....	97
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	101

## RESUMO

RIBEIRO, Joselito Nardy, M.S., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2001. **Efeitos de própolis, antocianina e naringenina em coelhos normais e diabéticos.** Orientadora: Tânia Toledo de Oliveira. Conselheiros: Tânus Jorge Nagem e Maria Goreti de Almeida Oliveira.

A diabetes é uma doença crônica que se caracteriza por eliminação freqüente de urina, sede incontrolável, emagrecimento e níveis elevados de triacilgliceróis e glicose no sangue. Neste trabalho, verificaram-se os efeitos da própolis e de flavonóides em coelhos normais e com diabetes induzida pela droga aloxano. O experimento foi dividido em três ensaios biológicos. No primeiro, os animais foram submetidos ao tratamento com a própolis em forma de comprimido de 150 mg e com a mistura de flavonóides, em forma de cápsulas, contendo 10 mg de antocianina e 10 mg de naringenina. No segundo ensaio, outros coelhos foram submetidos ao tratamento com própolis em forma de cápsulas de 150 mg e com antocianina também em cápsulas de 20 mg. No terceiro ensaio, verificou-se a possibilidade de efeitos adversos que as substâncias testadas nos dois ensaios anteriores pudessem ocasionar nos metabolismos mineral, protéico, lipídico e de carboidratos de animais sadios. Os resultados do primeiro ensaio indicaram que a aplicação da droga aloxano ocasionou perda de peso corporal e aumento dos níveis de triacilgliceróis e glicose no plasma sanguíneo dos animais. Verificou-se, também, que tanto a

própolis quanto a mistura de flavonóides provocaram ganho considerável de peso corporal nos grupos de animais tratados com essas substâncias. Além disso, mesmo que estatisticamente não-significativo, essas substâncias ocasionaram queda visível nos níveis de glicose e triacilgliceróis no sangue dos coelhos. No segundo ensaio, verificou-se que, após a aplicação da droga aloxano, ocorreu aumento dos níveis de triacilgliceróis e glicose no sangue dos animais, bem como perda de peso corporal. Observou-se, também, tendência de tanto a própolis quanto a antocianina proporcionarem certo ganho de peso aos animais. Com relação aos níveis de triacilgliceróis e glicose, constatou-se tendência de queda desses constituintes no sangue dos animais tratados com as referidas substâncias, embora os resultados não fossem significativos do ponto de vista estatístico. Por fim, no terceiro ensaio, verificou-se que, de modo geral, as substâncias testadas nos dois ensaios anteriores não provocaram efeitos adversos consideráveis no metabolismo de coelhos saudáveis.

## ABSTRACT

RIBEIRO, Joselito Nardy, M.S., Universidade Federal de Viçosa, February, 2001. **Propolis, anthocyanin and naringenin effects on normal and diabetic rabbits.** Adviser: Tânia Toledo de Oliveira. Committee Members: Tânus Jorge Nagem and Maria Goreti de Almeida Oliveira.

Diabetes is a chronic disease characterized by frequent elimination of urine, excessive thirst, weight loss and high levels of triacylglycerols and glucose in the blood. In this work, the effects of propolis and flavonoids were verified on normal rabbits and on rabbits having diabetes induced by the drug aloxane. The experiment was divided in three biological assays. In the first assay, the animals were undergone treatment with propolis in the form of 150 mg tablets and with a flavonoid mixture, in the form of capsules, containing 10 mg anthocyanin and 10 mg naringenin. In the second assay, other rabbits were undergone treatment with propolis in the form of 150 mg capsules and with anthocyanin also in 20 mg capsules. In the third assay, the possibility of adverse effects that the substances tested in the two previous assays could cause to the mineral, protein, fat and carbohydrate metabolisms of healthy animals was verified. The results of the first assay indicated that the application of aloxane caused loss of corporal weight and increased the triacylglycerol and glucose levels in the blood plasma of the animals. It was also verified that propolis as well as the flavonoid mixture produced considerable earnings of corporal weight in the groups of

animals treated with those substances. Besides, even not being statistically significant, those substances caused visible reduction in the glucose and triacylglycerol levels of the rabbits' blood. In the second assay, an increase of glucose and triacylglycerol levels in the animals' blood, as well as loss of corporal weight, was verified after the application of aloxane. It was also observed a tendency for propolis and anthocyanin to produce some weight earnings in the animals. With relation to triacylglycerol and glucose levels, it was verified a tendency to reduction of those constituents in the blood of the animals treated with the above mentioned substances, although the results were not significant from the statistical point of view. Finally, in the third assay, it was verified that, in general, the substances tested in the two previous assays did not cause considerable adverse effects on the metabolism of healthy rabbits.

## **1. INTRODUÇÃO**

A diabete é uma doença tão antiga quanto a própria humanidade. Um documento médico egípcio, escrito há cerca de 3.500 anos e conhecido como papiro Ebers, faz referência a uma doença que se caracterizava por eliminação freqüente e abundante de urina. O grande Aretaeus, médico romano (30-90 da era cristã), relatou em suas anotações uma doença cujos principais sintomas eram eliminação freqüente de urina, sede incontrollável e emagrecimento, atribuindo-a a influências perniciosas que afetariam a bexiga e os rins. Foi esse

médico que criou o termo *Dia-betes*, que significa “passar através”, pelo fato de a poliúria, um dos sintomas mais típicos da doença, se assemelhar à drenagem de água através de um sifão (ARDUINO, 1980).

A diabetes é uma das doenças crônicas mais comuns no mundo, que afeta de forma gravíssima não apenas a saúde do homem, como também a economia de muitos países. Em 1997, a Organização Mundial de Saúde (OMS) registrou cerca de 142,5 milhões de casos de diabetes em todo o planeta, onde 36,8% desses casos ocorriam em países do Primeiro Mundo e 63,2% nos países em desenvolvimento. No final de 2000, foi estimado que o número de casos de diabéticos em todo o planeta era de 154,4 milhões (PAZ et al., 2000).

A diabetes é uma doença na qual o açúcar do sangue se encontra em níveis elevados quando o paciente está em jejum, além de ser acompanhado por alterações no metabolismo de carboidratos e também de lipídios e proteínas. Essas alterações são uma consequência do déficit da secreção ou déficit da ação da insulina (PALLARDO, 1997).

É comum a ocorrência de níveis elevados de triacilgliceróis em pacientes portadores de diabetes. Esse fenômeno está diretamente relacionado com a redução da atividade da lipase lipoprotéica. A função desta enzima é hidrolisar os triacilgliceróis em ácidos graxos livres e glicerol, cuja ação é dependente dos níveis circulantes de insulina que se apresenta ausente ou com ação ineficaz em portadores de diabetes (HOWARD, 1987; ABBATE e BRUNAEL, 1990).

A droga aloxano, que também é conhecida como 2,4,5,6-tetraoxoexaidropirimidina monoidratada, tem sido largamente utilizada como agente indutor de diabetes em modelos animais, desde a descoberta de sua relativa citotoxicidade para as células beta do pâncreas (MORDESS e ROSSINI, 1981; GORRAY et al., 1986).

Os flavonóides são substâncias encontradas em diversos tipos de alimentos de origem vegetal, como maçã, uva, cebola roxa e outros. Além disso, eles se apresentam como os pigmentos mais importantes na coloração das flores. Tais substâncias provavelmente ocorrem em todas as angiospermas (RAVEN et al., 1996; COOK e SAMMAN, 1996; BATLOUNI, 1997).

Tem-se observado que os flavonóides exibem grande quantidade de efeitos farmacológicos, como efeito antibacteriano, antiviral (HANASAKI et al.,

1994), antiinflamatório, antialérgico (HOPE et al., 1983; Middleton e Kandaswami, 1993, citados por COOK e SAMMAN, 1996; HANASAKI et al., 1994), vasodilatador (DUARTE et al., 1993) e outros.

A própolis é uma resina produzida pelas abelhas (GHISALBERTI, 1979). É uma substância aromática, cuja temperatura de fusão oscila entre 64 e 69 °C. A cor varia de acordo com as plantas de origem, podendo ser verde, cinzenta, preta etc. As abelhas utilizam a própolis, na colônia, para vários fins, como reduzir as aberturas das colméias e embalsamar animais invasores que são mortos por abelhas-soldado. A própolis é utilizada também para fins anti-sépticos (BIRI e ALBERT, 1983; CRANE, 1990).

Verifica-se, através de diversos trabalhos científicos, que a própolis possui inúmeras propriedades farmacológicas, como efeito antibacteriano (GRANGE e DAVEY, 1990), antiviral (AMOROS et al., 1992), antiprotozoário (STARZYK et al., 1997), antitumoral (FRENKEL et al., 1993), antiinflamatório (DOBOWOLSKI et al., 1991; VOLPERT e ELSTNER, 1996) etc.

O objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos de flavonóides e da própolis em coelhos normais e diabéticos. Os flavonóides testados foram a antocianina e a naringenina, sendo a antocianina testada de maneira isolada e também em associação com a naringenina. Foi realizado também um ensaio toxicológico, para verificar a possibilidade de efeitos adversos causados por essas substâncias sobre o peso corporal e sobre os metabolismos mineral, protéico, lipídico e de carboidratos de coelhos normais.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. A diabete**

#### **2.1.1. Histórico**

A diabete é uma doença conhecida desde a antiguidade. O conhecido Galeno (131-201 da era cristã) descreveu este mal como consequência de uma fraqueza dos rins. Nesse remoto período da história, os observadores relatavam que a hereditariedade era importante, porque muitos membros da mesma família eram afetados por essa “doença da água doce”. Em 1776, Dobson descobriu que o sangue dos diabéticos era adocicado e que a urina continha açúcar fermentável. Cawley, em 1788, observou pela primeira vez, na autópsia de um diabético, que o pâncreas estava destruído. Rollo, em 1796, foi o primeiro médico a propor a restrição dietética no tratamento do diabetes, assinalando, num paciente, o hálito cetônico (“maçã passada”). No século XIX, Brockman, em seus estudos com peixes, e mais tarde Langerhans, em seus estudos com humanos, descreveram grupos de células no pâncreas como pequenas ilhas num mar de tecido pancreático. Essas ilhotas perfazem um total de 1% do pâncreas. Dois cientistas alemães, Von Mering e Minkowski, relataram, em 1889, que, se o pâncreas fosse retirado, o animal em estudo desenvolveria diabete. Mais tarde, cientistas descobriram que, mesmo se o pâncreas fosse destruído, o animal não desenvolveria a diabete se as ilhotas

fossem preservadas. Em 1921, Banting e Best, trabalhando em Ontário, no Canadá, começaram um projeto de pesquisa histórico e importante. Quando obtiveram tecido das ilhotas picado e purificado e injetaram o material em um animal com diabetes, observaram que os níveis sanguíneos de açúcar do animal baixaram. Isso foi um importante evento para muitos milhares de diabéticos espalhados pelo mundo todo e assinalou uma nova era no tratamento dessa doença. Embora essa descoberta parecesse a solução para os problemas da diabetes, tornou-se aparente que a simples administração de insulina não era suficiente para alterar o estado básico desta síndrome em muitos pacientes (KRALL, 1983; ARDUINO, 1980).

### **2.1.2. A diabetes no mundo atual**

Até o final de 2000, o número de casos de diabéticos, no mundo, foi estimado em 154,4 milhões. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), este número chegará a 299,9 milhões em 2025, quando 76% dos casos estarão situados em países do Terceiro Mundo. No Brasil, há previsão de que nesse mesmo espaço de tempo o número de doentes atinja a cifra dos 11 milhões. Atualmente, os custos econômicos diretos e indiretos decorrentes dos gastos com esta doença, em nosso país, representam cerca de 5 a 14% do total direcionado à saúde (PAZ et al., 2000). Hoje, o Brasil já é o sexto colocado no "ranking" mundial da doença, enquanto a Índia, primeira colocada, conta com um número preocupante de 50 milhões de doentes portadores desta síndrome (LUCÍRIO e WUSTHOF, 2000).

### **2.1.3. Características gerais da diabetes**

Os níveis de glicose sanguínea são mantidos pelos carboidratos provenientes da dieta alimentar e também do glicogênio do fígado. Ao penetrar na corrente sanguínea, a glicose é imediatamente enviada para as células, onde pode ser utilizada como energia em um processo conhecido como oxidação celular. Além disso, a glicose pode, também, ser convertida em glicogênio para armazenagem no fígado ou músculo em um processo denominado gliconeogênese. Em outro processo conhecido como lipogênese,

a glicose é levada para um caminho que resulta na formação de gordura, que por sua vez é armazenada no tecido adiposo (MAHAN e KRAUSE, 1994).

Para sair da corrente sangüínea e entrar nas células, a glicose precisa ser transportada, e esse transporte para o interior da maioria das células depende da presença de um hormônio conhecido como insulina, que se apresenta anexo aos locais receptores nas membranas celulares. Quando ocorre ausência de insulina suficiente ou redução de sua eficácia, a glicose não pode mais atravessar a membrana da célula, e a consequência disso é que esse açúcar acaba se acumulando na corrente sangüínea, levando à hiperglicemia. Foram relatadas algumas exceções, em que a entrada da glicose para o interior das células não depende da insulina. Esse fato é observado em células do cérebro, do fígado, do cristalino dos olhos, das hemácias e da medula renal (MAHAN e KRAUSE, 1994).

O conceito de diabetes depende da visão de cada especialista. Para o patologista, por exemplo, a diabetes é uma doença que afeta todos os tecidos do organismo, mas em particular os pequenos vasos sangüíneos dos rins, dos olhos e do sistema nervoso. Para o fisiologista, a diabetes é uma doença que afeta as funções de diferentes órgãos. No entanto, para um bioquímico, é uma enfermidade na qual o açúcar do sangue se encontra em níveis elevados quando a vítima está em jejum, além de ser acompanhado por alterações no metabolismo de carboidratos e também de lipídios e proteínas. Para o geneticista, existe forte predisposição hereditária dos indivíduos para desenvolver diabetes, enquanto para o oftalmologista a diabetes é a principal causa de diminuição da visão e da cegueira (KRALL, 1983; PALLARDO, 1997).

Quando se fala em diabetes, é preciso ressaltar que ela se divide em duas categorias. Uma delas, a menos comum, é denominada tipo I, responsável por cerca de 5 a 10% de todos os casos da doença, cujos sintomas surgem por volta dos sete anos de idade. Por algum motivo ainda desconhecido, o organismo sofre uma desordem metabólica, e suas células de defesa atacam e destroem as células do pâncreas, que por sua vez passa a produzir pouca insulina. Se o paciente ficar sem injeções desse hormônio, ele correrá sérios riscos de vida (LUCÍRIO e WUSTHOF, 2000).

Já a diabetes responsável pelo maior número de indivíduos doentes é a do tipo II. Ao contrário da diabetes tipo I, aqui o pâncreas tem pouca

participação. O problema principal está no resto do corpo. Afetadas por fatores externos, as células ficam insensíveis à insulina. O mais importante desses fatores é a obesidade, cada vez mais comum nos dias de hoje. A gordura afeta o fígado, que tem a função de armazenar a glicose não aproveitada pelo organismo; se ele estiver comprometido, pode devolver à corrente sanguínea um açúcar alterado, defeituoso, incapaz de entrar nas células. Outro fator que costuma predispor a diabetes é o passar dos anos, uma vez que, com o envelhecimento do indivíduo, as células perdem naturalmente a capacidade de capturar a glicose na corrente sanguínea. Estima-se que, acima dos 60 anos de idade, cerca de 17% da população se torna diabética (LUCÍRIO e WUSTHOF, 2000).

#### **2.1.4. O pâncreas**

O pâncreas é um órgão que está situado abaixo e atrás do estômago. Foi verificado que ele possui duas funções bioquímicas principais: em uma delas, as células exócrinas produzem enzimas digestivas para a secreção no intestino e, em outra, as células endócrinas produzem e secretam hormônios peptídicos que regulam o metabolismo energético em todo o corpo. Esses hormônios produzidos pelo pâncreas são a insulina, o glucagon e a somatostatina. A produção hormonal ocorre em agregados de células especializadas, chamadas de "ilhas de Langerans". Esses agregados são chamados de ilhotas porque se organizam em pequenas aglomerações de formato irregular dentro do pâncreas, órgão que possui cerca de um milhão dessas ilhas. Paul Langerans foi o médico alemão que descreveu essas ilhas pela primeira vez no ano de 1869. Cada tipo de célula dessas ilhotas produz um único hormônio: as células  $\alpha$  produzem o glucagon, as células  $\beta$  a insulina e as células  $\delta$  a somatostatina (KRALL, 1983; LEHNINGER, 2000; LUCÍRIO e WUSTHOF, 2000).

### 2.1.5. A insulina

A insulina é um peptídeo (M<sub>r</sub> 5.700) com duas cadeias polipeptídicas, A e B, unidas por pontes dissulfeto. Ela é produzida nas células β do pâncreas na forma de um precursor inativo que possui uma única cadeia. Esse precursor é chamado de pré-pro-insulina e apresenta uma seqüência sinalizadora aminoterminal, que direciona sua passagem para as vesículas secretoras. A remoção proteolítica da seqüência aminoterminal sinalizadora e a formação de três pontes dissulfeto produzem a pró-insulina, que é armazenada em grânulos secretores nas células β. Quando a concentração elevada da glicose desencadeia a secreção de insulina, a pró-insulina é convertida em insulina ativa por uma peptidase específica, que cliva duas ligações peptídicas para formar a molécula da insulina madura (LEHNINGER, 2000).

A seqüência de aminoácidos da insulina bovina foi determinada por Sanger em 1953, trabalho que lhe valeu o Prêmio Nobel cinco anos depois. Esse trabalho abriu caminho para que diversas outras espécies tivessem as seqüências de aminoácidos de suas insulinas determinadas. Com isso, observou-se que as cadeias A das insulinas dos humanos, porcos, cães, coelhos e do esperma de baleias são idênticas. As principais diferenças nas cadeias A das insulinas ocorrem nas posições 8, 9 e 10. Nos humanos, estas são Tre-Ser-Ileu; em vacas, Ala-Ser-Val; e em carneiros, Ala-Gly-Val (SOLOMONS, 1983).

Facilitar a entrada de moléculas de glicose para dentro das células não é a única função da insulina. Ela promove também o armazenamento subsequente de gordura. Isso ocorre devido ao estímulo provocado pela insulina na atividade da enzima lipase lipoprotéica, que exerce, entre outras, a função de facilitar a captação de triacilgliceróis pelo tecido adiposo. Na ausência de insulina ou ineficácia de sua atividade, a captação pelo tecido adiposo acaba sendo diminuída, e, como conseqüência, aumentam-se os triacilgliceróis no sangue (MAHAN e KRAUSE, 1994).

### **2.1.6. A diabetes e a elevação plasmática dos triacilgliceróis**

As doenças cardiovasculares lideram as causas de óbito entre os indivíduos diabéticos. Estudos têm evidenciado que a incidência de mortalidade por doença arterial coronária em indivíduos diabéticos é cerca de três vezes maior do que a observada na população em geral (PYORAL et al., 1987; STAMLER et al., 1993).

A diabetes confere maior risco para o desenvolvimento de doença arterial coronária, independentemente das faixas etárias e dos níveis de colesterol analisados. Alterações lipoprotéicas, freqüentes nesses pacientes e principalmente naqueles com controle insatisfatório, contribuem para ocorrência de manifestações ateroscleróticas, muitas vezes de forma precoce (ROSENGREN et al., 1989; RUBIES et al., 1993; STAMLER et al., 1993).

A hipertrigliceridemia representa uma das alterações lipoprotéicas mais comuns na diabetes. A elevação plasmática dos triacilgliceróis está diretamente relacionada à redução da atividade da lipase lipoprotéica. Essa enzima é responsável pela hidrólise dos triacilgliceróis em ácidos graxos livres e glicerol, e sua ação está vinculada aos níveis circulantes de insulina (HOWARD, 1987; ABBATE e BRUNAEL, 1990).

### **2.1.7. A indução de diabetes em cobaias pela droga aloxano**

A droga aloxano, que também é conhecida como 2,4,5,6-tetraoxoexaidropirimidina monoidratada, tem sido largamente utilizada como agente indutor de diabetes, em animais-modelo, desde a descoberta de sua relativa citotoxicidade para as células beta ( $\beta$ ) do pâncreas (MORDESS e ROSSINI, 1981; GORRAY et al., 1986).

Estudos morfológicos evidenciam que, na indução da diabetes por aloxano, as células  $\beta$  do pâncreas são destruídas, o que resulta, após um período de aproximadamente cinco dias, em severa e persistente redução da insulina sérica, redução do número de células  $\beta$  no pâncreas e nas ilhotas e perda de peso (GORRAY et al., 1986). A injeção intravenosa de aloxano causa rapidamente danos às células  $\beta$  das ilhotas. No início, há rápida queda de

glicose no sangue para níveis hipoglicêmicos, provavelmente como resultado da liberação da insulina pelas células  $\beta$  danificadas. Depois de poucos dias, a glicose do sangue volta a aumentar, passando a ser usualmente mantida em níveis elevados. Nesse ponto, as células  $\beta$  estão degeneradas, sendo o conteúdo de insulina no pâncreas reduzido para níveis muito baixos. O mecanismo de ação do aloxano em destruir células  $\beta$  não está claro, pois se sabe que essa substância também é capaz de produzir danos ao fígado e aos rins (BONDY, 1969).

## **2.2. Os flavonóides**

Os flavonóides são substâncias encontradas em diversos tipos de alimentos de origem vegetal. Esses alimentos podem ser, por exemplo, maçã, uva, cebola, repolho, brócolis, vinho tinto etc. Além disso, eles se apresentam como os pigmentos mais importantes nas cores das flores. Essas substâncias, provavelmente, ocorrem em todas as angiospermas e são esporadicamente encontradas em membros de outros grupos. Nas folhas, os flavonóides bloqueiam a penetração da radiação ultravioleta, que danifica os ácidos nucléicos e as proteínas. Eles, seletivamente, absorvem luz de cores azul, verde e vermelha, que são importantes para a fotossíntese (RAVEN et al., 1996; COOK e SAMMAN, 1996; BATLOUNI, 1997).

Depois que as células fotossintetizantes deixam de existir, os flavonóides são liberados e podem ser detectados em sucos e resinas de plantas. Muitos membros da família dos flavonóides possuem cores atraentes e, como consequência, representam papel fundamental na ecologia das plantas, tomando flores e frutos atraentes para abelhas e pássaros. Não há nenhuma evidência de que os flavonóides possam ser produzidos em células animais; eles aparecem em células humanas provenientes de alimentos de origem vegetal (KUHNAU, 1976).

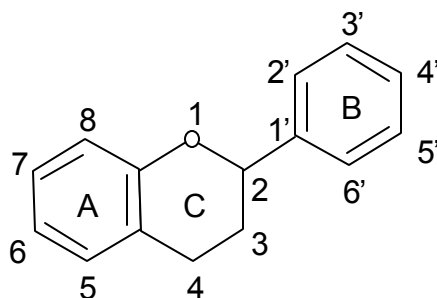
As plantas evoluíram ao produzir flavonóides para exercerem diversas funções, além das já citadas, como proteção contra fungos parasitas, herbívoros, organismos patogênicos e injúrias que possam causar oxidação nas células vegetais. Essas substâncias se tornaram, também, fonte de

alimento para insetos que promovem a polinização (SWAIN, 1986; HARBORNE, 1986; 1988).

### 2.2.1. As classes e a estrutura química dos flavonóides

Os flavonóides constituem um grupo de compostos polifenólicos com baixo peso molecular. Eles apresentam dois anéis aromáticos de seis carbonos, que estão ligados por uma unidade de três carbonos ( $C_6-C_3-C_6$ ). A variação do estado de oxidação da parte  $C_3$  e a localização da segunda unidade aromática determinam as propriedades e as classes dos flavonóides. Os anéis desse composto são referidos como A, B e C (Coulate, 1990, citado por COOK e SAMMAN, 1966; IRAN, 1991; RAVEN et al., 1996).

A estrutura geral dos flavonóides pode ser vista na Figura 1. Variações nesse esqueleto básico determinam as diferenças entre os diversos flavonóides.



Fonte: COOK e SAMMAN (1996)

Figura 1- Estrutura geral dos flavonóides.

A maioria das classes dos flavonóides apresenta múltiplas variações em suas estruturas devido às substituições que ocorrem nessas moléculas. Tais substituições incluem: hidrogenação, hidroxilação, metilação, malonização, sulfatação e glicosilação (HARBORNE, 1986; 1988). Muitos flavonóides ocorrem naturalmente como compostos glicosilados com um ou

mais grupos hidroxilas fenólicos combinados com resíduos de açúcar. Os carboidratos substituintes podem ser: D-glicose, L-ramnose, glucoramnose, galactose, lignina e arabinose. A quercitrina, a rutina e a robinina são os flavonóides glicosilados mais comuns na dieta (KUHNAU, 1976; HAVSTEEN, 1983; IRAN, 1991).

### **2.2.2. As antocianinas**

As antocianinas são os pigmentos principais, responsáveis pelas cores das flores. Muitas dessas substâncias se apresentam nas cores vermelho e azul. Elas são hidrossolúveis e localizam-se nos vacúolos. A cor de um pigmento antocianínico depende da acidez encontrada no vacúolo; por exemplo, a cianidina é vermelha em meio ácido, violeta em meio neutro e azul em meio básico. Em algumas plantas, as flores mudam de cor após a polinização, geralmente pela grande produção de antocianinas (RAVEN et al., 1996).

As antocianinas não estão presentes apenas como pigmentos de flores, mas aparecem também em uvas roxas, morangos, amoras pretas, jabuticabas, cerejas, casca da batata-doce, cebola roxa, repolho roxo etc. (FREUND et al., 1988).

### **2.2.3. A naringenina**

A naringenina é um flavonóide que pertence à classe das flavanonas. Essa substância apresenta-se sem cor e é encontrada, em grande quantidade, em frutas cítricas; sua importância se deve ao fato de, por reações químicas simples, darem origem às diidrochalconas, compostos de sabor doce bem acentuado e substitutos em potencial da sacarose (BOBBIO e BOBBIO, 1995).

### **2.2.4. O metabolismo dos flavonóides em animais**

BRAVO et al. (1994) estudaram a degradação dos compostos polifenólicos, catequinas e ácido tânico em trato intestinal de ratos da raça Wistar. Estes animais foram alimentados com 0,5 g/dia desses compostos

durante um período de três semanas. Eles observaram a ocorrência de baixa fermentação dessas substâncias na flora intestinal dos animais e que menos de 5% do que havia sido ingerido de catequinas e ácido tânico tinha sido excretado de forma inalterada, o que indica absorção desses compostos por parte do organismo desses animais.

Embora não tivessem sido observadas interações de catequinas e ácido tânico com proteínas digestivas, foram verificadas alterações no metabolismo lipídico de ratos alimentados com tais substâncias. É postulado que catequinas influenciam o metabolismo lipídico, por estimularem a excreção da bile, que por sua vez possui efeito hipocolesterolêmico (MURAMATSU et al., 1986; BRAVO et al., 1994).

NAGEM et al. (1994) observaram que quando se tratava de ratos, via intubação gástrica, com diversos flavonóides, dentre eles a naringenina, ocorria aumento da síntese de enzimas responsáveis pela metabolização de drogas.

A respeito dos flavonóides antocianinas, a Joint Fao/Who Expert Committee on Food Additives (1982), citada por FRINHANI (1998), demonstrou que essas substâncias são pouco absorvidas pelo trato gastrointestinal. A limitação do metabolismo animal de antocianinas pode ser devida a transformações dessas substâncias por enzimas produzidas pela flora bacteriana. Até aquele momento, metabólitos de antocianinas ainda não haviam sido identificados.

### **2.2.5. O metabolismo dos flavonóides em humanos**

As informações a respeito da absorção, metabolismo e excreção de flavonóides em seres humanos ainda são escassas (COOK e SAMMAN, 1996). Muitos estudos indicaram que a absorção dessas substâncias ocorre logo após a administração oral (DAS, 1971), enquanto outros evidenciaram que elas são pouco absorvidas, não atingem a circulação geral e formas inalteradas dessas substâncias apresentam níveis de concentrações mensuráveis (GUGLER et al., 1975).

Observou-se que o trajeto dos flavonóides pelo trato gastrointestinal e sua subsequente absorção e metabolismo ainda necessitam de mais estudos. Alguns polifenóis dietéticos, como a quercetina (Gugler e Dengler, 1973;

Hollman et al., 1993, citados por MILLER e RICE-EVANS, 1997) e as catequinas (Hackett e Griffiths, 1985, citados por MILLER e RICE-EVANS, 1997), parecem ser absorvidos pelo homem, mas a extensão dessa absorção não é bem clara. Apesar de os estudos da excreção urinária de flavonóides administrados oralmente serem empregados por pesquisadores como medida da absorção, a excreção de flavonóides também pode ser demonstrada pela bile (Ueno et al., 1983, citados por MILLER e RICE-EVANS, 1997). Além disso, os flavonóides podem sofrer degradação no intestino para compostos de baixo peso molecular, como hidroxibenzoatos e hidroxicinamatos, que são rapidamente absorvidos e excretados na urina (Booth et al., 1958, citados por MILLER e RICE-EVANS, 1997).

GUGLER et al. (1975) investigaram o metabolismo da quercetina em seis voluntários (quatro homens e duas mulheres), com idade de 21 a 32 anos. Após a administração oral de uma dose única de 4 g, não foram detectadas concentrações mensuráveis deste flavonóide ou de seus derivados no plasma ou na urina. Entretanto, aproximadamente 53% da dose oral foi recuperada nas fezes, sem sofrer modificações, o que demonstrou determinada absorção da dose original de quercetina.

#### **2.2.6. Os flavonóides e suas propriedades farmacológicas**

Estudos de diversos pesquisadores têm demonstrado várias bioatividades de flavonóides (HERTOG et al., 1993). Tem-se relatado, por exemplo, que os flavonóides inibem a peroxidação de lipídios (RATTY e DAS, 1988; Salvayre et al., 1988, citados por COOK e SAMMAN, 1996) e agregação de plaquetas (BERETZ et al., 1986; GRYGLEWSKI et al., 1987; BOURDILLAT et al., 1988; BERETZ e CAZENAVE, 1988; ROBAK et al., 1988; TZENG et al., 1991). Os flavonóides também exercem efeitos antioxidantes, atuando contra radicais livres (CAVALLINI et al., 1978; FRAGA et al., 1987).

DRENSKA et al. (1989) verificaram que as antocianinas possuem atividade anticonvulsivante, enquanto TAMURA et al. (1994) demonstraram que esses flavonóides possuem atividade antiinflamatória.

NAGEM et al. (1994) investigaram a ação dos flavonóides formonometina, biochanina A, genisteína, daidzeína, naringenina, rutina,

quercetina, morina, genistina, daidzina, quercitrina, kaempferol e isoquercitrina do cultivar de soja UFV 5 sobre o metabolismo do colesterol, HDL colesterol, LDL + VLDL, triacilgliceróis, fosfolipídios e sobre os sais biliares, quando administrados em ratos machos da raça *Wistar*, por intubação gástrica. Além disso, eles testaram esses compostos como agentes indutores na síntese de enzimas metabolizadoras de drogas. Tais pesquisadores observaram que quercitrina, isoquercitrina, formonometina, biochina A, rutina e quercetina foram os flavonóides que mais influenciaram na diminuição dos teores de lipídios. Com relação aos sais biliares, os flavonóides quercitrina, isoquercitina, formonometina, biochina A, rutina e quercetina influenciaram o aumento das concentrações desses sais. Tais resultados estão de acordo com os obtidos por Cohen et al. (1990), citados por NAGEM et al. (1994), quando testando o efeito de diferentes proporções de alfafa, rica em compostos flavonídicos, na dieta de animais, observaram que aqueles que ingeriram maior proporção de alfafa tinham níveis de colesterol e outros lipídios mais baixos e teores de sais biliares aumentados, o que é vantajoso, pois os sais biliares são os responsáveis pela emulsão dos lipídios. Os resultados de NAGEM et al. (1994) indicaram, ainda, que formonometina, biochanina A, daidzeína, quercetina e isoquercitrina influenciaram os teores de HDL colesterol e LDL + VLDL colesterol, apresentando teores mais baixos das frações lipídicas analisadas. Isso é interessante, pois se sabe que a arterosclerose coronariana está relacionada a uma alta relação LDL:HDL (PINCKNEY e PINCKNEY, 1973).

NAGEM et al. (1994) verificaram, também, que todos os compostos flavonídicos testados induziram a síntese de enzimas metabolizadoras de drogas.

OLIVEIRA et al. (1997) verificaram alta ação de inibição da enzima aldose redutase de *E. coli*, por parte dos compostos morina e quercitrina, a uma concentração de  $10^{-4}$  M desses flavonóides. No entanto, verificou-se também que, a uma concentração de  $10^{-5}$  M, os flavonóides que mais inibiram a aldose redutase foram: naringenina, rutina e quercetrina. A aldose redutase é uma enzima que catalisa a redução de glicose e galactose, produzindo sorbitol e dulcitol, respectivamente, usando como co-fator o NADH (Kinoschita, 1965, citado por OLIVEIRA et al., 1997). Essa enzima tem sido encontrada em tecidos de animal como córnea, retina, sangue etc. A excessiva presença de

sorbitol em ratos e humanos diabéticos causa a formação de cataratas (HEYNINGEN, 1959; VARMA e KINOSHITA, 1976; Lerner et al., 1984, citados por OLIVEIRA et al., 1997).

NAGEM et al. (1999) estudaram a ação de naringina e dos corantes naturais antocianina e carmin de maneira isolada e em associação no metabolismo lipídico de ratos adultos machos, da raça *Wistar*. Esses pesquisadores dosaram colesterol, colesterol-HDL e triacilgliceróis, após a administração de duas doses dos compostos isoladamente e em misturas. Os resultados indicaram redução estatisticamente significativa dos níveis de colesterol e triacilgliceróis, sobressaindo-se os tratamentos com naringina + antocianina e naringina + carmin, inclusive com efeitos sinérgicos. Com relação aos níveis de colesterol-HDL, aqueles autores observaram elevação acentuada dessa lipoproteína no tratamento com Triton (substância que foi usada para indução de níveis altos de colesterol nos animais) e que ela não apresentou redução dos seus níveis com a administração das substâncias testadas. Isso foi considerado satisfatório, já que o colesterol-HDL é responsável pelo transporte do colesterol dos tecidos periféricos para o fígado, onde é metabolizado. Ainda assim, embora não estatisticamente significativo, os resultados evidenciaram tendência de aumento de colesterol-HDL, com ênfase nos tratamentos com naringina + antocianina e naringina isoladamente, que apresentaram as maiores percentagens de variação. Segundo aqueles pesquisadores, isso, possivelmente, permitirá incluir, no futuro, essa classe de constituintes químicos na prevenção de doenças cardiovasculares.

LIMA (2000) investigou os efeitos farmacológicos dos flavonóides e corantes naturais extraídos do urucum no metabolismo lipídico de coelhos. Os resultados desse trabalho indicaram ação eficaz dos flavonóides e corantes extraídos e identificados dos cultivares do urucum no metabolismo lipídico de coelhos e suas ações ativadoras sobre a enzima lipase pancreática *in vitro*. O referido autor realizou dois ensaios. No primeiro ensaio foram utilizados coelhos da raça Nova Zelândia, com alto teor de colesterol (hipercolesterolemia) induzido por Triton, os quais receberam as substâncias luteolina, apigenina e bixina 30 e 95% de pureza, na dose de 0,01 mol kg<sup>-1</sup> de peso corporal, por via intraperitoneal. O sangue foi coletado 24 horas após a aplicação das substâncias, e os teores de colesterol, colesterol-HDL e

triacilgliceróis foram analisados no soro desses animais. Todas as substâncias foram eficientes na redução do colesterol total, sendo a bixina 30% a substância mais eficiente. Essa bixina 30% poderia conter outras substâncias, como luteolina e apigenina, por não estar tão pura como a bixina 95%.

Com relação ao colesterol-HDL, LIMA (2000) verificou a eficiência da substância apigenina em promover maior aumento no nível desse constituinte no soro. Tal efeito é benéfico, pois, de acordo com LEITE et al. (1994), esses níveis de colesterol-HDL constituem um fator de proteção nas coronariopatias.

Quanto à redução nos níveis de triacilgliceróis, LIMA (2000) obteve resultado satisfatório com a administração da bixina 30%, que reduziu em 88,66% o nível de triacilgliceróis em relação ao grupo tratado com ração e com a substância indutora de hipercolesterolemia (Triton).

Por fim, no segundo ensaio biológico, LIMA (2000) trabalhou com os flavonóides quercetina, rutina, norbixina e bixina 95%. Todas essas substâncias reduziram os teores de colesterol no soro sangüíneo dos coelhos, sendo o melhor resultado apresentado pela bixina. Já o nível de triacilglicerol foi mais reduzido pelas substâncias quercetina e rutina e pela associação entre a bixina e a quercetina. A substância que promoveu maior aumento no nível de colesterol-HDL foi o flavonóide rutina. Todos os flavonóides testados neste trabalho apresentaram ação ativadora da lipase. De acordo com LEHNINGER (2000), esta enzima catalisa a hidrólise enzimática dos triacilgliceróis. As lipases, no intestino, operam na digestão e absorção das gorduras da alimentação.

### **2.2.7. A toxicologia dos flavonóides**

A toxicidade de flavonóides para animais e humanos parece ser extremamente rara, já que nenhum resíduo de flavonóide foi encontrado em acúmulo no corpo (KUHNAU, 1976). No entanto, têm-se relatado reações adversas devido à administração de flavonóides em doses farmacológicas crônicas (JAEGER et al., 1988) quando se excede o recomendado, que é de 23 mg/dia (HERTOG et al., 1993) a 170 mg/dia (KUHNAU, 1976). Efeitos tóxicos têm sido documentados com a administração de doses de 1 a 1,5 mg/dia de flavonóides, como o cianidanol. Esses efeitos são: falha renal

grave, anemia hemolítica, trombocitopenia, hepatite, febre e reações adversas na pele (CRIQUI e RINGEL, 1994).

CRIQUI e RINGEL (1994) verificaram que, com uma dieta de 2% de quercetina, ratos desenvolviam câncer de bexiga. No entanto, HIRONO et al. (1981) não observaram essa doença quando administraram acima de 10% desse mesmo flavonóide na dieta de ratos.

TIMBERLAKE e HENRY (1988), estudando, durante 90 dias, os efeitos de antocianinas extraídas de uvas *Vitis labrusca* na reprodução de cães e ratos, observaram efeito colateral em cães Beagle machos, no entanto estes animais consumiram menos alimentos e, por causa disso, perderam massa corpórea durante as cinco primeiras semanas de estudo. Em duas gerações de ratos houve perda de paladar e perda de peso de alguns órgãos, como o fígado. Entretanto, nenhum efeito colateral foi observado quando se estabeleceu um nível de 7,5% de antocianinas na dieta, equivalente a cerca de 5 mg/kg de peso corporal/dia.

### **2.3. A própolis**

A própolis é uma resina produzida por abelhas que misturam as substâncias coletadas de diferentes partes da planta – como brotos, botões florais etc. – com as secreções produzidas em seu organismo, dando origem a um material de coloração e consistência variadas (GHISALBERTI, 1979). Tal substância se apresenta resinosa, amarga e aromática, e sua temperatura de fusão oscila entre 64 e 69 °C. As abelhas utilizam a própolis na colônia, onde pode estar sozinha ou misturada com cera, para construção e adaptação de seus ninhos. Esses insetos empregam a própolis para muitos fins, como: reduzir as aberturas das colméias e embalsamar animais invasores mortos por abelhas operárias. Em particular, quando o animal intruso é de maior porte e não pode ser removido, ele é, então, embalsamado para se evitar a sua putrefação no interior da colméia. Às vezes, o apicultor se depara com cadáveres de animais embalsamados com própolis. As abelhas utilizam a própolis também para fins anti-sépticos (BIRI e ALBERT, 1983; CRANE, 1990).

### 2.3.1. Os constituintes da própolis

A separação de frações da própolis é difícil por causa da complexidade de sua composição. Uma maneira comum de se extrair a própolis é a que utiliza álcool, em que se têm uma fração solúvel conhecida como bálsamo de própolis e uma fração insolúvel, conhecida como cera (GHISALBERTI, 1979). Atualmente, o extrato mais comum de própolis é aquele de onde esta é extraída com etanol. Outros solventes têm sido utilizados para extração da própolis, com o objetivo de se separar e identificar seus constituintes (VILLANUEVA et al., 1964; CIZMÁRIK e MATEL, 1970; HLADÓN et al., 1980; BANKOVA et al., 1983, 1988, 1989; MANOLOVA et al., 1985; ANDRICH et al., 1987; CORTANI, 1987, 1991; GRUNBERGER et al., 1988; NEYCHEV et al., 1988; Ross, 1990, citado por MARCUCCI, 1995).

GREENAWAY et al. (1990) identificaram, entre outros, o flavonóide naringenina num extrato de própolis. Já VILLANUEVA et al. (1970) identificaram o flavonóide pinocembrina, que também foi identificado por TAZAWA et al. (1998), numa própolis proveniente do Estado de Minas Gerais.

GREENAWAY et al. (1991) identificaram mais de 150 constituintes da própolis proveniente do leste e centro europeu, usando para isso cromatógrafo a gás acoplado ao espectrofotômetro de massa (GC-MS). Entre esses compostos foram encontrados vários tipos de flavonóides.

TATEFUJI et al. (1996), utilizando técnicas como CLAE (HPLC), RMN- $C^{13}$ , RMN- $H^1$  etc., isolaram e identificaram alguns compostos constituintes da própolis obtida da região de Manaus, no Estado do Amazonas. Esses compostos foram os seguintes: ácido 5- cafeoilquínico, ácido clorogênico, ácido 4- cefeoilquínico, ácido 4,5- dicafeoilquínico, ácido 3,5- dicafeoilquínico e ácido 3,4 dicafeoilquínico.

TAZAWA et al. (1998), estudando a própolis brasileira proveniente do Estado de Minas Gerais, conseguiram isolar e identificar 24 compostos, utilizando para isso técnicas como RMN- $C^{13}$ , RMN- $H^1$ , CLAE (HPLC), UV etc. Essa própolis foi extraída com etanol 75%. Entre esses compostos foram encontrados os flavonóides pinocembrina, diidrokaempferídeo, kaempferídeo, isosakuratenina e betuletol.

Outros diversos autores, que contribuíram enormemente para separar e identificar inúmeros constituintes da própolis, são citados por MARCUCCI (1995).

### **2.3.2. A própolis e seus fins terapêuticos**

Por centenas de anos, vários povos têm empregado a própolis para diversos fins medicinais (GHISALBERTI, 1979). Hoje, isso pode ser verificado através de diversos trabalhos científicos, que relatam inúmeras propriedades farmacológicas da própolis, como os efeitos antibacteriano (GRANGE e DAVEY, 1990), antiviral (AMOROS et al., 1992), antiprotozoário (STARZYK et al., 1997), antitumoral (FRENKEL et al., 1993), antiinflamatório (DOBOWOLSKI et al., 1991; VOLPERT e ELSTNER, 1996), regenerador do tecido cartilaginoso (SCHÉLLER et al., 1977), inibidor de formação de radicais livres (SCHELLER et al., 1989; VOLPERT e ELSTNER, 1993) etc.

Um efeito hepatoprotetor por parte da própolis também tem sido observado por efeito de destruição de radicais livres (GONZÁLEZ et al., 1995).

Em muitos animais, tem-se induzido a diabetes melitus, usando para isso a droga conhecida como estreptozocina (STZ), que estimula a produção de radicais livres que causam a destruição e disjunção de células  $\beta$  pancreáticas (TURK et al., 1993; UCHIGATA et al., 1982; KANETO et al., 1995). No entanto, MATSUSHIGE et al. (1996) verificaram que o nível de destruição de células  $\beta$  por STZ foi bem menor na presença de própolis e que o resultado obtido com extrato aquoso de própolis foi mais satisfatório do que o com extrato alcoólico contendo metanol e própolis.

MATSUNO et al. (1997) extraíram um composto de uma própolis brasileira, o qual foi denominado PRF-1 e teve seu peso molecular estimado em mais de 30 kD. Foi verificado que esse composto absorve no UV no comprimento de onda de 260-280 nm. Esse composto se mostrou agente antioxidante, podendo auxiliar no tratamento de doenças crônicas, como diabetes e hepatite. Também, mostrou-se citotóxico para células de carcinomas hepáticos e de pulmão.

HIGASHI e CASTRO (1994) constataram que um extrato de própolis obtido da Sigma Chemical foi eficiente no combate ao parasita *Trypanosoma cruzi*, que é o agente causador do mal-de-chagas.

Muitas substâncias presentes na própolis têm diversas atividades biológicas, dentre elas os flavonóides. Os efeitos bioquímicos destas substâncias podem ser divididos em quatro categorias: capacidade de ligar-se a metais pesados, catalisar transporte de elétrons, habilidade de ligar-se a radicais livres e afinidade de ligar-se à polímeros biológicos (HAVSTEEN, 1983).

### **2.3.3. A toxicidade da própolis**

A introdução de um composto com fins terapêuticos, tanto em medicina humana como veterinária, requer uma série de estudos, que têm por finalidade demonstrar não somente o lado benéfico deste composto, mas também seus possíveis efeitos colaterais, ou seja, um estudo da sua toxicidade é imprescindível para que ele seja definitivamente utilizado como fármaco (HOLLANDS et al., 1991).

Quando se faz uso da própolis em quantidades exageradas ocorrem efeitos colaterais (MONTI et al., 1983; MACHACKOVA, 1985; TOSTI et al., 1985; YOUNG, 1987; HAY e GREIG, 1990). A própolis contém alguns compostos que podem ocasionar algum efeito tóxico: a dermatite, que ocorre em apicultores, é bem conhecida (HAUSEN et al., 1987ab).

HAUSEN et al. (1987b) observaram a incidência de cerca de 200 casos, em humanos, de dermatite alérgica ocasionada pelo contato desses indivíduos com a própolis. Eles identificaram a substância ácido 1,1-dimetilalilcaféico (LB- 1) e responsabilizaram-na por essa alergia.

Schmalle et al. (1986), citados por MARCUCCI (1995), encontraram na própolis outro composto responsável por reações alérgicas, o qual foi denominado tectocrisina; eles identificaram-no como sendo um flavonóide. A sensibilidade com relação a essa substância foi considerada baixa.

Uma administração oral adequada de própolis, sem exageros, pode evitar as reações alérgicas decorrentes da ingestão dessa resina (ANGELINI et al., 1987; HAUSEN et al., 1987ab; KLEINHANS, 1987).

DOBOWOLSKI et al. (1991), administrando uma dose oral de aproximadamente 700 mg kg<sup>-1</sup> de própolis em 10 ratos (5 fêmeas e 5 machos) e monitorando esses animais por 48 horas, verificaram que a dose foi bem tolerada e nenhuma morte ocorreu durante esse tempo.

HOLLANDS et al. (1991), realizando estudo da toxicidade de própolis cubano em ratos, observaram alteração de uréia no soro sanguíneo dessas cobaias. Eles explicaram que os resultados que indicaram alteração na uréia sérica eram devidos ao álcool etílico presente no extrato de própolis que esses animais ingeriram diariamente durante três meses. No entanto, afirmaram, também, que a própolis exerceu alguma influência nos níveis de uréia no soro sanguíneo, pois havia animais que tinham sido tratados somente com água e o nível de uréia sérica deles se apresentou inferior ao daqueles animais tratados com solução aquosa de própolis, ou seja, o nível de uréia sérica em animais tratados com extrato aquoso de própolis se apresentou menor do que daqueles tratados com extrato alcoólico, porém foi maior que daqueles animais tratados só com água.

ARVOUET-GRAND et al. (1993) verificaram que a administração oral de própolis em diferentes doses demonstrou que a dose letal (DL<sub>50</sub>) com extrato de própolis foi superior a 7.340 mg/kg em camundongos. Resultados anteriores, com valores menores, foram obtidos por HRYTSENKO et al. (1977), ou seja, de DL<sub>50</sub>= 2.050 mg/kg e DL<sub>100</sub>= 2.750 mg/kg. Tais disparidades de valores chamam a atenção para a padronização de extratos de própolis. É importante que os métodos de extração, estocagem e fonte sejam padronizados. Trabalhos de pesquisadores russos utilizando extratos de própolis demonstraram que extratos etéricos dessa substância, testados em camundongos brancos nas doses de 350 mg/kg, não foram tóxicos. No entanto, extratos alcoólicos e etéricos de própolis, após 19 horas de administração, apresentaram DL<sub>50</sub> na dose de 700 mg/kg (GHISALBERTI, 1979).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Etapas do experimento

Este experimento foi dividido em três ensaios biológicos. No primeiro, verificaram-se os efeitos da própolis em forma de comprimido de 150 mg e da mistura dos flavonóides antocianina (10 mg) e naringenina (10 mg), em forma de cápsulas, em coelhos diabéticos. Neste ensaio foi medido o peso corporal dos animais, como também dosados os níveis de triacilgliceróis e glicose no soro sangüíneo dessas cobaias aos 0, 7, 14, 21, 28 e 35 dias.

No segundo ensaio, investigaram-se os efeitos da própolis (150 mg) em forma de cápsulas e do flavonóide antocianina (20 mg), também nessa forma, em coelhos diabéticos. Os procedimentos realizados foram idênticos ao do primeiro ensaio.

O terceiro ensaio foi realizado com a finalidade de verificar os possíveis efeitos colaterais que as substâncias testadas nos dois ensaios anteriores pudessem ocasionar no peso corporal e nos metabolismos lipídico, mineral, protéico e de carboidratos de coelhos normais. Para isso, realizou-se a pesagem dos animais e dosaram-se os níveis de triacilgliceróis, colesterol HDL, colesterol LDL, colesterol total, glicose, proteína total, albumina, transaminase glutâmico pirúvico (TGP), transaminase glutâmico oxaloacético (TGO), gama-glutamil transferase

(gama-GT), cálcio, fósforo e cloretos nos soros sanguíneos desses animais aos 0, 15 e 30 dias.

### 3.2. Primeiro ensaio biológico

Este ensaio teve como objetivo testar os efeitos da própolis, em comprimidos de 150 mg, fornecida pela CONAP (Cooperativa Nacional de Apicultores) da Cidade de Belo Horizonte, MG, e da mistura, em forma de cápsulas, dos flavonóides antocianina de 10 mg e naringenina de 10 mg em coelhos diabéticos. A antocianina foi doada pela indústria Christian Hansen. Essa substância consiste de um corante em forma de pó proveniente de uva roxa, que é hidrossolúvel e freqüentemente utilizado na indústria de alimentos. As principais antocianinas contidas nesse pó são peonidina, malvidina, delphinidina e petunidina. A naringenina em forma de pó é proveniente de laranja e foi obtida, também, da indústria Christian Hansen.

#### 3.2.1. Período de adaptação dos animais

Foram utilizados, para este primeiro ensaio biológico, 24 coelhos machos albinos com aproximadamente dois meses de idade, da raça Nova Zelândia, fornecidos pelo Setor de Cunicultura da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG.

Após a chegada desses animais no Laboratório de Biofármacos, eles foram acondicionados em gaiolas individuais. Aí permaneceram, à temperatura ambiente, por cinco dias, para adaptação, recebendo água à vontade e sendo alimentados, diariamente, com 120 g de ração para coelhos nas diversas fases da criação, da marca Linha Natural da Purina. Essa ração continha, de acordo com o fabricante, por quilograma do produto: ferro 30 mg, cobre 25 mg, zinco 260 mg, manganês 100 mg, iodo 2 mg, cobalto 1,5 mg, vitamina A 8.000 UI, vitamina D<sub>3</sub> 1.500 UI, vitamina E 20 UI, colina 900 mg, niacina 40 mg, ácido pantotênico 12 mg, riboflavina 3 mg, vitamina B<sub>12</sub> 4 mcg e antioxidante 100 mg. Além disso, o fabricante revelou que o produto possui 13,0% de umidade, 14,0% de proteína bruta, 1,5% de extrato etéreo, 20,0% de matéria fibrosa, 15% de matéria mineral,

2,5% de cálcio e 0,5% de fósforo. A composição básica dessa ração era: alfafa desidratada, carbonato de cálcio, farelo de arroz, farelo de soja, farelo de trigo, fosfato bicálcico, milho integral moído, cloreto de sódio (sal comum), melação, premix mineral vitamínico e refinazil.

### 3.2.2. Primeiro dia de experimento e medida de peso corporal

Após cinco dias de adaptação, os animais ficaram em jejum por 12 horas, após o que seus pesos foram medidos, para verificar se no decorrer do experimento esses animais ganhariam ou perderiam massa corporal. Para essa medida, utilizou-se uma balança da marca Digipeso DP 3000, com capacidade máxima de 15 kg e mínima de 125 g com divisão de 5 g.

### 3.2.3. Primeira quantificação de triacilgliceróis e glicose

Após a pesagem, os 24 animais foram submetidos à primeira dosagem de triacilgliceróis e glicose. Essa primeira dosagem teve como objetivo verificar qual a concentração normal desses constituintes no sangue dos coelhos antes de terem sido submetidos à droga aloxano que induz a diabetes.

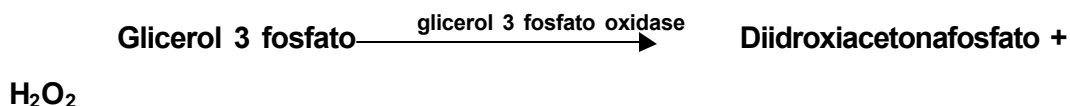
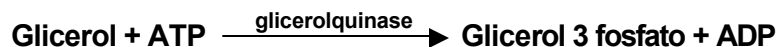
Para essa dosagem, cada animal foi imobilizado, cujo sangue foi retirado, introduzindo-se um tubo capilar na região dos olhos do animal, conhecida como “plexo venoso oftálmico”. Após a introdução do tubo, a cabeça do animal foi tombada, e o sangue escorreu, através do capilar, para um tubo de ensaio devidamente esterilizado e numerado. Esse procedimento não afetou a visão do animal.

Após a retirada de sangue, os tubos de ensaio foram colocados dentro de uma caixa de isopor com gelo e levados para uma centrífuga com velocidade máxima de 7.000 rpm. O sangue foi centrifugado a 3.000 rpm por 15 minutos, à temperatura ambiente. Após a centrifugação, retiraram-se 500  $\mu$ L do sobrenadante (soro), os quais foram transferidos para uma pequena cubeta de plástico, para a dosagem de triacilgliceróis e glicose.

### 3.2.3.1. Dosagem de triacilgliceróis

A dosagem dos triacilgliceróis séricos foi realizada por via inteiramente enzimática, utilizando-se "kits" da marca BIOLAB e o aparelho de dosagens multiparamétrico, conhecido como Alizé.

O princípio do método foi o seguinte: a enzima lipase degradou o triacilglicerol em glicerol e ácidos graxos. O glicerol obtido reagiu com ATP, em presença da glicerolquinase, gerando o glicerol 3 fosfato e ADP. O glicerol 3 fosfato foi oxidado a diidroxiacetonafosfato, pela glicerol fosfato oxidase, liberando água oxigenada. Esta, juntamente com paraclorofenol e amino-4-antipirina, em presença da peroxidase, transformou-se no cromogênio (que absorve em comprimento de onda de 505 nm), liberando água. Esse processo pode ser assim sumariado:



### 3.2.3.2. Dosagem de glicose

Na análise de glicose, também se utilizaram o "kit" da marca BIOLAB e o aparelho de dosagens multiparamétrico Alizé. As reações que ocorreram foram as seguintes:





#### 3.2.4. Indução de diabetes pela droga aloxano

Após a primeira análise de sangue e ainda em jejum, 18 coelhos receberam a droga aloxano (Sigma). O objetivo da aplicação dessa droga foi induzir a diabetes nos animais. Seis coelhos não foram submetidos ao aloxano, os quais formaram o grupo-controle, que só recebeu ração e foi denominado grupo G1. O aloxano foi preparado da seguinte maneira: o pó de aloxano foi dissolvido em água destilada numa concentração de  $100 \text{ mg mL}^{-1}$ . Para que o pó se dissolvesse corretamente, ele foi colocado num recipiente em banho-maria a  $37^\circ\text{C}$ . Após a dissolução, aplicaram-se  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  de peso do animal, ou seja, um animal com  $1,5 \text{ kg}$  recebeu uma dosagem de  $1,5 \text{ mL}$  de aloxano. Para realizar essa aplicação, o animal foi imobilizado em uma guilhotina de madeira. Essa aplicação foi feita na veia marginal de uma das duas orelhas do coelho, com cuidado, pois o produto é muito tóxico e, quando entra em contato com a pele, forma uma cor rósea.

Decorridas três horas, os animais foram alimentados com  $120 \text{ g}$  de ração.

#### 3.2.5. Aplicação de glicose 50% para evitar a hipoglicemia

Após três horas da aplicação da droga aloxano, foram administrados via injeção intraperitoneal, em cada um dos 18 animais,  $10 \text{ mL}$  da solução 50% de glicose da Merck. Esse procedimento foi repetido por mais duas vezes a cada quatro horas e teve como objetivo evitar a hipoglicemia (que leva os animais à morte), que surge após as primeiras horas de aplicação da droga aloxano. Essa hipoglicemia ocorre porque, de acordo com BONDY (1969), as células  $\beta$  destruídas pelo aloxano lançam, inicialmente, grande quantidade de insulina no sangue.

Após o consumo dessa insulina, o nível de glicose volta a subir e ultrapassa o normal.

Após a aplicação da glicose, os animais permaneceram por uma semana alimentados, diariamente, com 120 g de ração.

### 3.2.6. Segunda pesagem e exame de sangue

Após sete dias de aplicação da droga aloxano, foram realizadas a segunda pesagem e a dosagem de triacilglicerol e glicose no sangue, para verificar a indução da diabete. O procedimento de análise foi o mesmo descrito anteriormente, e todos os animais apresentaram níveis altos de glicose em relação ao grupo-controle.

### 3.2.7. Separação dos grupos para tratamentos

Após a constatação de que os animais estavam diabéticos, eles foram separados, de acordo com os seguintes grupos:

**Grupo 1 (G1):** foi composto por seis animais saudáveis, que não foram submetidos à aplicação da droga aloxano. Este grupo recebeu apenas 120 g de ração diariamente e água à vontade.

**Grupo 2 (G2):** foi composto por seis animais diabéticos, que receberam apenas 120 g de ração diariamente e água à vontade.

**Grupo 3 (G3):** foi composto por seis animais diabéticos, que receberam 120 g de ração, um comprimido de própolis de 150 mg diariamente e água à vontade.

**Grupo 4 (G4):** foi composto por seis animais diabéticos, que receberam 120 g de ração, uma cápsula contendo a mistura de antocianina 10 mg + naringenina 10 mg diariamente e água à vontade.

Após a separação dos grupos, iniciou-se o tratamento com as substâncias. As pesagens e as dosagens de triacilgliceróis e glicose foram realizadas novamente aos 14, 21, 28 e 35 dias.

### 3.3. Segundo ensaio biológico

Neste ensaio foram utilizados 24 coelhos machos, albinos, da raça Nova Zelândia, com idade entre dois e três meses, provenientes do Setor de Cunicultura da UFV. Os procedimentos realizados foram idênticos aos do primeiro ensaio, só que agora as substâncias testadas nos animais diabéticos foram: própolis em forma de cápsulas de 150 mg e antocianina em forma de cápsulas de 20 mg, em que a antocianina foi a mesma utilizada no primeiro ensaio e o pó de própolis foi obtido a partir da própolis bruta coletada na Cidade de Itapeçerica, no Estado de Minas Gerais. Tal própolis foi coletada pelo método CPI (Coletor de Própolis Inteligente).

Após a constatação de que todos os coelhos ficaram diabéticos, os grupos foram separados da seguinte maneira:

**Grupo 5 (G5)**: foi formado por seis animais saudáveis, que receberam 120 g de ração diariamente e água à vontade.

**Grupo 6 (G6)**: foi formado por seis animais diabéticos, que receberam apenas 120 g de ração diariamente e água à vontade.

**Grupo 7 (G7)**: foi formado por seis animais diabéticos, que receberam 120 g de ração e uma cápsula de própolis de 150 mg diariamente, além de água à vontade.

**Grupo 8 (G8)**: foi formado por seis animais diabéticos, que receberam 120 g de ração e uma cápsula de

antocianina de 20 mg diariamente, além de água à vontade.

#### 3.4. Terceiro ensaio biológico

Este ensaio teve como objetivo verificar se as substâncias testadas nos dois ensaios anteriores provocam algum efeito adverso no peso corporal e nos metabolismos mineral, protéico, lipídico e de carboidratos de coelhos normais. Para isso, os animais tiveram suas massas corpóreas medidas, além de serem dosados os constituintes do sangue: triacilgliceróis, colesterol total, colesterol-HDL, colesterol-LDL, glicose, proteína total, albumina, TGP, TGO, fósforo, cálcio, cloro e gama-GT. Neste ensaio foram utilizados 30 coelhos saudáveis, machos e albinos da raça Nova Zelândia, com idade em torno de dois meses. Os procedimentos realizados nesta etapa foram idênticos aos conduzidos nos dois ensaios anteriores, com exceção da aplicação da droga aloxano, que não ocorreu neste terceiro ensaio.

Os 30 coelhos foram divididos nos seguintes grupos:

Grupo 9 (G9): foi composto por seis animais, que receberam apenas 120 g de ração diariamente e água à vontade (grupo-controle).

Grupo 10 (G10): foi formado por seis animais, que receberam 120 g de ração e uma cápsula de 100 mg de talco farmacêutico diariamente, além de água à vontade. Neste grupo, verificou-se que houve algum efeito deste talco (usado para completar os volumes de todas as cápsulas das substâncias testadas anteriormente) no metabolismo dos animais.

**Grupo 11 (G11)**: foi formado por seis animais, que receberam 120 g de ração e uma cápsula de própolis de 150 mg diariamente, além de água à vontade.

**Grupo 12 (G12)**: foi formado por seis animais, que receberam 120 g de ração e uma cápsula de antocianina de 20 mg diariamente, além de água à vontade.

**Grupo 13 (G13)**: foi formado por seis animais, que receberam 120 g de ração e uma cápsula contendo a mistura de 10 mg de antocianina + 10 mg de naringenina diariamente, além de água à vontade.

A pesagem dos animais e os exames de sangue foram realizados aos 0, 15 e 30 dias.

Neste terceiro ensaio biológico, foram dosados triacilgliceróis e glicose da maneira descrita anteriormente, além de outros constituintes, que serão descritos nos tópicos subseqüentes.

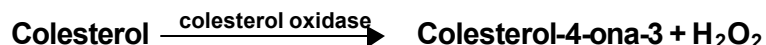
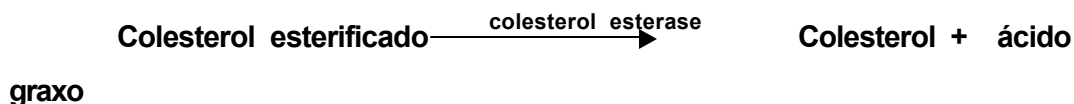
#### 3.4.1. Dosagem de triacilgliceróis e glicose

Estas dosagens foram realizadas da mesma forma como descrito nos ensaios anteriores, utilizando-se o aparelho Alizé e "kits" da marca BIOLAB.

#### 3.4.2. Dosagem do colesterol total

Na análise colorimétrica do colesterol foram utilizados o "kit" da marca BIOLAB e o aparelho Alizé. O soro foi obtido pela centrifugação do sangue. Esta análise baseou-se na transformação do colesterol esterificado em colesterol e ácido graxo, mediado pela enzima colesterol esterase. O colesterol formado foi oxidado pela enzima colesterol oxidase em colesterol-4-ona-3, liberando água oxigenada. Esta, juntamente com o

fenol e amino-4-antipirina, pela ação da peroxidase, foi transformada no cromogênio (que absorve em 500 nm) e em água, segundo o esquema abaixo:



### 3.4.3. Dosagem de coolesterol-HDL

O método desta dosagem se baseou na precipitação dos quilomícrons e das lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e de baixa densidade (LDL) contidos no soro a ser analisado, pela adição de 50  $\mu\text{L}$  do ácido fosfotúngstico ( $40 \text{ g L}^{-1}$ ) na presença do íon magnésio ( $100 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{MgCl}_2$ ) em pH 6,2. Após a adição do ácido fosfotúngstico na presença do íon magnésio, deixou-se a mistura em repouso por 10 minutos e a centrifugou a 5.000 rpm por 15 minutos, à temperatura ambiente. O sobrenadante obtido pela centrifugação continha as lipoproteínas de alta densidade (HDL), cujo coolesterol foi determinado pelo mesmo processo descrito anteriormente, na dosagem de coolesterol total.

Foram utilizados "kit" da marca BIOLAB e o aparelho Alizé.

### 3.4.4. Dosagem de coolesterol-LDL

O método de dosagem se baseou na separação das proteínas de baixa densidade (LDL) e na determinação do coolesterol ligado a essas frações. Neste caso, adicionou-se em 50  $\mu\text{L}$  do soro 1 mL de um precipitante que contém surfactante aniônico policíclico ( $0,4 \text{ g L}^{-1}$ ), surfactante aniônico policíclico policondensado ( $0,8 \text{ g L}^{-1}$ ), dioxano

polissubstituído ( $12,4 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e tampão imidazol pH 6,10 ( $25 \text{ mmol L}^{-1}$ ). Após a adição do precipitante no soro, a mistura foi deixada em repouso por 30 minutos, à temperatura de  $2^\circ \text{C}$ .

Após o repouso, centrifugou-se a mistura por cinco minutos a 4.000 rpm, à temperatura ambiente. Separou-se o sobrenadante, depois da centrifugação, invertendo tudo e descartando o sobrenadante. Dissolveu-se o precipitado com 0,5 mL de um reativo composto de citrato trissódico ( $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ ) e cloreto de sódio ( $0,11 \text{ mol L}^{-1}$ ).

O precipitado que foi solubilizado continha as lipoproteínas de baixa densidade (LDL), cujo colesterol foi determinado pelo mesmo processo descrito na dosagem do colesterol total.

Para esta dosagem, utilizaram-se "kit" da marca BIOLAB e o aparelho Alizé.

#### 3.4.5. Dosagem de proteína total

A proteína total do soro foi dosada, colorimetricamente, pelo método do tipo Biureto, que consiste em complexar a proteína com sais de cobre em meio alcalino, formando um complexo de coordenação entre o íon cúprico e quatro grupos NH das cadeias peptídicas. Esse complexo absorve em um comprimento de onda de aproximadamente 545 nm.

Para ser realizada esta dosagem, foi utilizado o equipamento de dosagens multiparamétrico de bioquímica (Alizé), bem como o "kit" da marca BIOLAB.

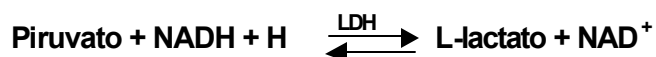
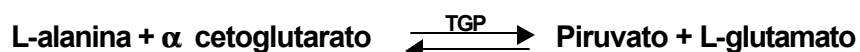
#### 3.4.6. Dosagem de cálcio

A dosagem colorimétrica do cálcio, presente no soro sanguíneo dos coelhos, sem desproteinização, foi determinada pelo indicador azul-de-metiltimol. Esta análise foi realizada com a adição da 8-hidroxiquinoleína, para que se pudesse evitar a interferência dos íons magnésio até uma concentração de  $10 \text{ mg dL}^{-1}$ .

Para realização desta dosagem, foi utilizado o equipamento de dosagens multiparamétrico de bioquímica (Alizé), bem como o "kit" da marca BIOLAB.

### 3.4.7. Dosagem da transaminase glutâmico pirúvico (TGP)

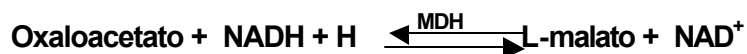
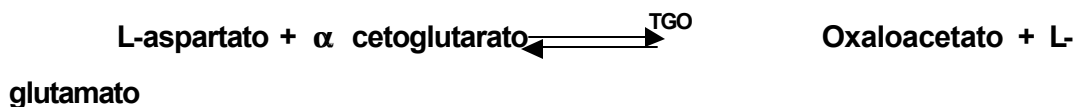
A determinação cinética da atividade da TGP se baseia na conversão da L-alanina e  $\alpha$  cetoglutarato em piruvato e L-glutamato, mediada pela TGP. O piruvato formado reage com NADH e o íon hidrônio, produzindo L-lactato e  $\text{NAD}^+$ , numa reação catalisada pela lactato desidrogenase (LDH), segundo as seguintes reações:



Para ser feita a dosagem, foram utilizados o equipamento de dosagens multiparamétrico de bioquímica (Alizé) e o "kit" da marca BIOLAB.

### 3.4.8. Dosagem da transaminase glutâmico oxalacético (TGO)

A determinação cinética da atividade da TGO se baseou na conversão da L-aspartato e  $\alpha$  cetoglutarato em oxaloacetato e L-glutamato, mediada pela enzima TGO. O oxaloacetato formado reage com NADH e o íon hidrônio, produzindo L-malato e  $\text{NAD}^+$ , numa reação catalisada pela enzima malato desidrogenase (MDH), segundo as reações



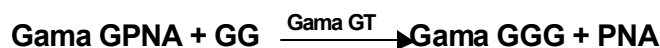
Para ser feita a dosagem, foram utilizados o equipamento de dosagens multiparamétrico de bioquímica (Alizé) e o "kit" da marca BIOLAB.

#### 3.4.9. Dosagem de fósforo

Resumidamente, o princípio desta dosagem é baseado no fato de que, em meio ácido, os íons fosfatos formam com o molibdato de amônia um complexo fosfomolibdico, cuja absorvância ocorre a 340 nm e é proporcional à concentração de íons fosfatos nas amostras de soro. Para essa dosagem, utilizaram-se, também, o "kit" da marca BIOLAB e o aparelho Alizé.

#### 3.4.10. Dosagem da gama-glutamil transferase (gama-GT)

A gama-GT é uma enzima que catalisa a transferência do grupamento glutamil da gama-glutamil P-nitroanilida (gama GPNA) para a glicilglicina (GG), formando gama-glutamil-glicilglicina (gama GGG) e P-nitroanilina (PNA).



A liberação da PNA é diretamente proporcional à atividade da gama glutamil transferase (gama GT) na amostra, sendo determinada através do produto corado (que absorve em 530 nm).

Para esta dosagem foram utilizados o "kit" da marca BIOLAB e o aparelho Alizé.

#### 3.4.11. Dosagem de cloretos

Os íons cloreto reagem com tiocianato de mercúrio formando cloreto de mercúrio e íons tiocianato, que reagem com os íons férrico formando tiocianato férrico, de cor amarela (que absorve em 470 nm),

proporcional à concentração de cloretos na amostra de soro. Para esta dosagem, utilizaram-se, também, o "kit" da marca BIOLAB e o aparelho Alizé.

#### 3.4.12. Dosagem de albumina

Em presença de albumina, o indicador verde-de-bromocresol forma um complexo corado, que exibe um espectro de absorção diferente do indicador na forma livre. A concentração deste complexo (que absorve em 630 nm) é proporcional à concentração da albumina na amostra de soro. O "kit" da marca BIOLAB e o aparelho Alizé também foram utilizados nesta dosagem.

#### 3.5. Tratamentos estatísticos dos dados obtidos

##### 3.5.1. Primeiro ensaio biológico

O primeiro ensaio biológico foi realizado segundo o delineamento inteiramente casualizado, com quatro tratamentos (G1 = ração, G2 = ração + aloxano, G3 = ração + aloxano + própolis 150 mg em forma de comprimido e G4 = ração + aloxano + a mistura em forma de cápsulas de antocianina 10 mg + naringenina 10 mg), em seis repetições.

O peso dos animais, a glicose e o triacilglicerol foram avaliados aos 0, 7, 14, 21, 28 e 35 dias.

Procedeu-se à análise de variância e ao teste F ( $P < 0,05$  e  $P < 0,01$ ). Os grupos-controle (G1 e G2) foram comparados entre si por meio do teste F, assim como os grupos-tratamento G3 e G4. A comparação dos grupos-tratamento com os grupos-controle foi realizada por meio do teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

O efeito do tempo foi verificado por meio de análise de regressão, utilizando-se a técnica de polinômios ortogonais, e o modelo mais adequado foi escolhido com base no coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e na significância dos coeficientes de regressão pelo teste t a 1 e 5% de probabilidade, respectivamente.

### 3.5.2. Segundo ensaio biológico

O segundo ensaio biológico foi realizado conforme o delineamento inteiramente casualizado, com quatro tratamentos (G5 = ração, G6 = ração + aloxano, G7 = ração + aloxano + própolis 150 mg em forma de cápsula e G8 = ração + aloxano + antocianina 20 mg em forma de cápsula), em seis repetições.

O peso dos animais, a glicose, o colesterol total e o triacilglicerol foram avaliados aos 0, 7, 14, 21, 28 e 35 dias.

Procedeu-se à análise de variância e ao teste F ( $P < 0,05$  e  $P < 0,01$ ). Os grupos-controle (G5 e G6) foram comparados entre si por meio do teste F, assim como os grupos-tratamento (G7 e G8). A comparação dos grupos-tratamento com os grupos-controle foi realizada por meio do teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

O efeito do tempo foi verificado por meio de análise de regressão, utilizando-se a técnica de polinômios ortogonais, e o modelo mais adequado foi escolhido com base no coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e na significância dos coeficientes de regressão pelo teste t a 1 e 5% de probabilidade, respectivamente.

### 3.5.3. Terceiro ensaio biológico

Este terceiro ensaio foi realizado segundo o delineamento inteiramente casualizado, com cinco tratamentos (G9 = ração, G10 = ração + 100 mg de talco farmacêutico em forma de cápsulas, G11 = ração + 150 mg de própolis em cápsulas, G12 = ração + 20 mg de antocianina em cápsulas e G13 = ração + 10 mg de antocianina + 10 mg de naringenina em cápsulas), em seis repetições.

Peso dos animais, glicose, colesterol total, HDL, LDL, triacilglicerol, proteína, albumina, TGP, TGO, fósforo, cálcio, cloro e gama GT foram avaliados aos 0, 15 e 30 dias.

Procedeu-se à análise de variância e ao teste F ( $P < 0,05$  e  $P < 0,01$ ).

Os grupos-controle (G9 e G10) foram comparados entre si por meio do teste F. Os grupos-tratamentos G11, G12 e G13 foram comparados entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ) e com os grupos-controle (G9 e G10), por meio do teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

O efeito do tempo foi verificado por meio do desdobramento do tempo dentro de tratamentos e testado pelo teste F ( $P < 0,05$  e  $P < 0,01$ ).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Primeiro ensaio biológico

#### 4.1.1. Efeitos das substâncias-teste no peso corporal

Os efeitos da própolis em forma de comprimido de 150 mg e da mistura de flavonóides em cápsulas contendo 10 mg de antocianina e 10 mg de naringenina foram avaliados sobre o peso corporal de coelhos machos albinos da raça Nova Zelândia submetidos à droga aloxano. O período de avaliação foi de 35 dias. Foram formados quatro grupos [**G1** = (ração), **G2** = (ração + aloxano), **G3** = (ração + aloxano + própolis em forma de comprimido de 150 mg) e **G4** = (ração + aloxano + mistura de flavonóides em cápsulas contendo 10 mg de antocianina + 10 mg de naringenina)], cada um contendo seis repetições.

No primeiro dia foram realizadas as pesagens dos animais para se verificar qual o peso normal deles antes de se lhes administrar o aloxano. Logo após essa pesagem, realizou-se a aplicação da droga.

Aos sete dias, realizou-se nova pesagem para verificar a ocorrência de algum efeito, provocado pelo aloxano, sobre o peso corporal dos animais. Nesse mesmo tempo, deu-se início aos tratamentos com as substâncias-teste.

Aos 14, 21, 28 e 35 dias, novas pesagens foram realizadas. Os dados obtidos foram submetidos aos tratamentos estatísticos específicos, cujos resultados estão apresentados no Quadro 1.

Quadro 1 – Peso médio, em kg, e percentual de variação em relação aos grupos-controle, em %, de coelhos submetidos a diferentes tratamentos e avaliados durante 35 dias

Tempo (dias)	Grupo Tratado	Peso (kg)	Variação (%) em Relação a:	
			G1	G2
0	G1 = ração (R)	1,728 A	-	-
	G2 = R + aloxano	1,693 A	-	-
	G3 = R + aloxano + própolis	1,771 a	-	-
	G4 = R + aloxano + antocianina + naringenina	1,882 a	-	-
7	G1	1,884 A	-	-
	G2	1,671 A	-	-
	G3	1,740 a	-7,64	+4,13
	G4	1,839 a	-2,39	+10,05
14	G1	2,064 A	-	-
	G2	1,618 B	-	-
	G3	1,811 a	-12,26	+11,93
	G4	1,938 a	-6,10	+19,78
21	G1	2,154 A	-	-
	G2	1,533 B	-	-
	G3	1,878 a	-12,81	+22,50
	G4	1,993 a	-7,47	+30,01
				*
28	G1	2,445 A	-	-
	G2	1,344 B	-	-
	G3	1,957 a	-19,96	+45,61 *
			*	
	G4	2,088 a	-14,60	+55,36 *
35	G1	2,618 A	-	-
	G2	1,243 B	-	-

G3	2,061 a	-21,28	+65,81 *
		*	
G4	2,207 a	-15,70	+77,55 *

Em cada tempo, A difere de B pelo teste F ( $P < 0,05$ ).

Em cada tempo, a difere de b pelo teste F ( $P < 0,05$ ).

\* Estatisticamente diferente do controle pelo teste de Dunnett ( $P < 0,05$ ), em cada tempo.

No primeiro dia de experimento, os grupos-controle (G1 e G2) eram estatisticamente semelhantes. Estes resultados são coerentes, pois G2 ainda não havia recebido o aloxano.

Aos sete dias, ou seja, uma semana após a aplicação do aloxano, os grupos-controle ainda não se diferenciavam estatisticamente. No entanto, verificou-se que o grupo saudável G1 apresentou ganho de peso em relação ao grupo G2, passando de 1,728 kg para 1,884 kg, enquanto o G2 reduziu de 1,693 kg para 1,671 kg.

Com relação aos grupos-tratamento, aos sete dias, eles também apresentaram perda de peso corporal, com a ressalva de que G3 reduziu de 1,771 kg para 1,740 kg e G4 passou de 1,882 kg para 1,839 kg. Deduziu-se, então, que após uma semana de aplicação da droga os animais já apresentavam quedas no peso, mesmo que estatisticamente desprezíveis.

Aos 14 dias, a diferença entre os grupos-controle passou a ser significativa, persistindo assim até o final do ensaio, o que demonstra que a droga provocou efeito no peso corporal dos animais, no intuito de reduzi-lo.

Sabe-se que a droga aloxano induz a diabete (GORRAY et al., 1986) e que o emagrecimento está entre as manifestações mais comuns ocorridas em indivíduos diabéticos (ARDUINO, 1979). Essa perda de peso devido à aplicação de aloxano foi verificada também por VARELA e MUNOZ (1990), que observaram decréscimo no peso corporal de ratos que se submeteram à aplicação do aloxano.

Quando foi comparado o grupo-tratamento G3 (que recebeu a própolis) com os grupos-controle, percebeu-se que durante todo o experimento, após a aplicação de aloxano, este grupo se distanciou do grupo saudável G1, com a

ressalva de que essa diferença se tornou significativa a partir dos 28 dias. No entanto, observou-se, também, que o grupo G3 ganhou peso corporal em relação ao grupo G2, ressaltando-se que ambos passaram a ser estatisticamente diferentes, também a partir dos 28 dias de experimento.

O grupo G3 ganhou massa corporal em relação ao grupo G2, passando de 1,740 kg aos sete dias para 2,061 kg aos 35 dias, enquanto o G2, nesse mesmo período, passou de 1,671 para 1,243 kg. Deduziu-se, então, que os resultados são satisfatórios do ponto de vista biológico, uma vez que indicam que a própolis pode ter influenciado o grupo G3 para que aumentasse de peso em relação ao grupo doente G2.

Quando foi comparado o grupo-tratamento G4 (antocianina + naringenina) com o grupo-controle G1, notou-se que durante o todo o ensaio, após a aplicação de aloxano, o grupo G1 teve ganho de peso mais acentuado do que o G4, mas a diferença entre eles não chegou a ser significativa. Percebeu-se também que o G4 teve ganho de peso em relação ao controle doente G2 durante todo o ensaio, com a ressalva de que a diferença entre esses dois grupos se tornou significativa a partir dos 21 dias. Esses resultados são promissores e indicam que a mistura dos flavonóides influenciou o grupo G4 para que proporcionasse ganho considerável de peso corporal.

Quando foram comparados os grupos-tratamento entre si, percebeu-se que durante todo o ensaio não houve diferença significativa entre esses grupos. Concluiu-se, com essa observação, que, do ponto de vista estatístico, tanto a própolis quanto a mistura de flavonóides exerceram a mesma influência sobre a massa corporal dos coelhos. No entanto, a mistura de flavonóides atuou mais cedo sobre o peso dos animais doentes, ou seja, aos 21 dias, ao passo que atuação significativa da própolis ocorreu aos 28 dias. Isso indica uma vantagem da mistura de flavonóides sobre a própolis, mesmo que isso não tenha relevância do ponto de vista estatístico.

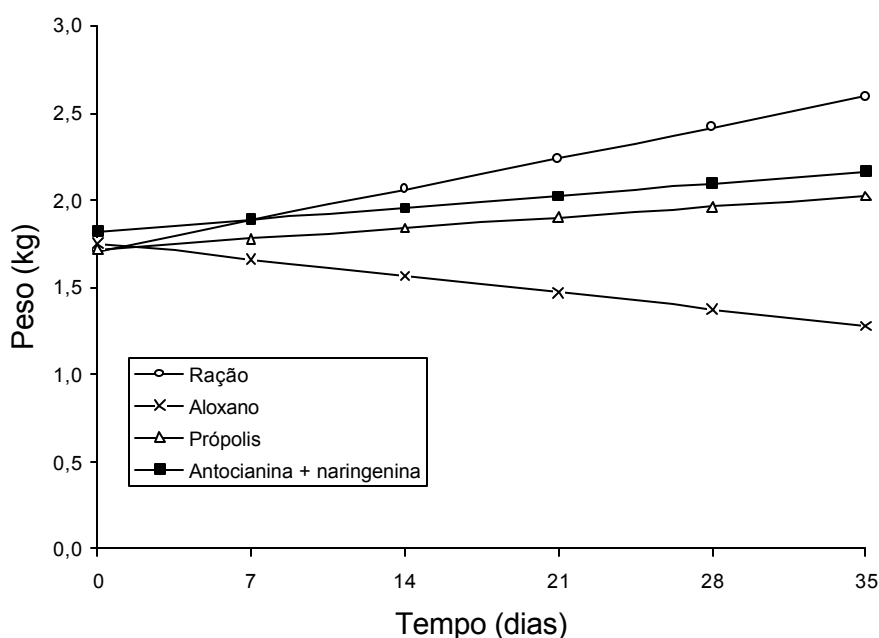
Em outro trabalho, Vertommen et al. (1994), citados por FRINHANI (1998), verificaram certo ganho de peso em ratos diabéticos que foram tratados com o flavonóide diosmina. Porém, esse ganho foi menor do que o observado em ratos saudáveis.

A Figura 2 ajuda a compreender melhor as observações realizadas no Quadro 1. Nessa figura, nota-se claramente que, apesar de os grupos-

tratamento não conseguirem acompanhar o grupo saudável, eles ganharam peso em relação ao grupo G2.

#### 4.1.2. Efeitos das substâncias-teste no teor de glicose

A avaliação dos efeitos da própolis (em forma de comprimido de 150 mg) e da mistura de flavonóides (em forma de cápsulas contendo 10 mg de antocianina + 10 mg de naringenina) nos níveis de glicose de animais



$$G1 = \text{ração: } \hat{Y} = 1,7046 + 0,02540 **T \quad R^2 = 0,98$$

$$G2 = \text{aloxano: } \hat{Y} = 1,7537 - 0,01354 **T \quad R^2 = 0,92$$

$$G3 = \text{própolis: } \hat{Y} = 1,7146 + 0,008853 **T \quad R^2 = 0,90$$

$$G4 = \text{antocianina + naringenina: } \hat{Y} = 1,8179 + 0,009891 **T \quad R^2 = 0,90$$

Figura 2 – Estimativa do peso de coelhos submetidos a diferentes dietas em função do tempo de avaliação.

hiperglicêmicos foi feita mediante um modelo experimental, utilizando-se coelhos machos albinos da raça Nova Zelândia com diabetes induzida pela droga aloxano. O período dessa avaliação foi de 35 dias. Os animais foram

distribuídos em quatro grupos [G1= (ração), G2= (ração + aloxano), G3= (ração + aloxano + própolis em forma de comprimido de 150 mg), G4= (ração + aloxano + mistura de flavonóides em cápsulas contendo 10 mg de antocianina + 10 mg de naringenina)], cada um contendo seis coelhos.

No primeiro dia foram dosados os níveis de glicose sangüínea, para se verificar a concentração normal deste carboidrato nos coelhos antes de lhes ser aplicado o aloxano.

Aos sete dias, nova dosagem foi realizada para se verificar a indução de diabete. Nesse mesmo tempo, iniciaram-se os tratamentos com as substâncias-teste.

Aos 14, 21, 28 e 35 dias, novas dosagens foram realizadas com o objetivo de avaliar os possíveis efeitos ocasionados pelas substâncias-teste sobre os níveis de glicose sangüínea dos animais hiperglicêmicos.

Os dados, aqui obtidos, foram submetidos a tratamentos estatísticos específicos, cujos resultados estão apresentados no Quadro 2.

No primeiro dia, os grupos-controle (G1 e G2) não diferiam estatisticamente entre si. Tais resultados estão coerentes, pois na primeira dosagem de sangue os animais ainda não haviam recebido o aloxano.

Aos sete dias (uma semana após a aplicação do aloxano), observou-se que a diferença entre os grupos-controle já era bastante evidente. Essa diferença persistiu até o final do ensaio. Esse resultado é satisfatório, pois evidencia que a droga aloxano induziu níveis elevados de glicose no sangue dos animais.

Assim, como neste experimento, outros pesquisadores também obtiveram sucesso na indução de hiperglicemia em animais experimentais, utilizando a droga aloxano. CHAUHAN et al. (1979), por exemplo, induziram diabetes em fêmeas de ratos albinos, administrando, via injeção intravenosa, uma dose de aloxano de 60 mg/kg de peso corporal do animal. Em outro trabalho, BEHERA e PATNAIK (1979) induziram diabetes em ratos *Swiss*, utilizando uma dose de aloxano de 100 mg/kg de peso corporal.

Aos 14 dias, observou-se que os grupos-tratamento ainda eram estatisticamente semelhantes ao grupo G2 e diferentes do grupo saudável G1. No entanto, percebeu-se certa redução nos teores médios de açúcar, tanto em G3 quanto em G4, quando comparados com o controle diabético G2.

Aos 21 dias, os grupos-tratamento ainda eram significativamente diferentes do grupo saudável G1 e semelhantes, do ponto de vista estatístico, ao grupo diabético G2. Porém, observou-se que tanto G3 quanto G4 se aproximaram do grupo saudável G1. Além disso, o grupo G4 apresentou redução de 3,82% no seu teor médio de glicose em relação ao grupo diabético G2.

Quadro 2 – Glicose média, em mg/dL<sup>-1</sup>, e percentual de variação em relação aos grupos-controle, em %, de coelhos submetidos a diferentes tratamentos e avaliados durante 35 dias

Tempo (dias)	Grupo Tratado	Glicose (mg/dL)	Variação (%) em Relação a:	
			G1	G2
0	G1 = ração (R)	149,93 A	-	-
	G2 = R + aloxano	156,43 A	-	-
	G3 = R + aloxano + própolis	150,70 a	-	-
	G4 = R + aloxano + antocianina + naringenina	145,13 a	-	-
7	G1	148,57 B	-	-
	G2	378,20 A	-	-
	G3	521,55 a	+251,05 *	+37,90
	G4	455,30 a	+206,45 *	+20,39
14	G1	146,53 B	-	-
	G2	370,05 A	-	-
	G3	477,32 a	+225,75 *	+28,99
	G4	407,40 a	+178,03 *	+10,09
21	G1	146,92 B	-	-
	G2	364,60 A	-	-

	G3	446,23 a	+203,72	+22,39
			*	
	G4	350,68 a	+138,69	-3,82
			*	
28	G1	141,12 B	-	-
	G2	359,22 A	-	-
	G3	425,08 a	+201,22	+18,33
			*	
	G4	334,80 a	+137,24	-6,80
			*	
35	G1	143,67 B	-	-
	G2	354,43 A	-	-
	G3	277,00 a	+92,80	-21,85
	G4	293,47 a	+104,27	-17,20

Em cada tempo, A difere de B pelo teste F ( $P < 0,05$ ).

Em cada tempo, a difere de b pelo teste F ( $P < 0,05$ ).

\* Estatisticamente diferente do controle pelo teste de Dunnett ( $P < 0,05$ ), em cada tempo.

Aos 28 dias, verificou-se que tanto G3 quanto G4 ainda eram estatisticamente diferentes do grupo saudável G1. No entanto, percebeu-se que esses tratamentos se aproximaram ainda mais desse grupo saudável. Além disso, G4 apresentou redução de 6,80% no seu teor médio de glicose, em relação ao grupo diabético G2.

Aos 35 dias, percebeu-se claramente que os grupos-tratamento já eram estatisticamente semelhantes ao grupo saudável G1. No entanto, esses grupos eram também semelhantes ao controle diabético G2. Observou-se, porém, que G3 e G4 apresentaram queda de 21,85 e 17,20%, respectivamente, em relação a G2.

Mesmo que esses resultados não sejam significativos do ponto de vista estatístico, do ponto de vista biológico eles são promissores, pois indicam tendência das substâncias-teste em reduzir os teores médios de glicose em animais hiperglicêmicos. Essa conclusão foi reforçada quando se compararam

os teores médios de glicose de G3 e G4 com os teores do controle diabético G2. Percebeu-se que, enquanto G2 se manteve praticamente constante durante todo o ensaio, após a aplicação de aloxano o grupo G3 apresentou queda de 521,55 mg/dL para 277,00 mg/dL, e o G4 reduziu de 455,30 mg/dL para 293,47 mg/dL.

Ao serem comparados os grupos-tratamento entre si, observou-se semelhança, do ponto de vista estatístico, entre eles. Isso significa que tanto a própolis quanto a mistura de flavonóides exerceram o mesmo efeito sobre os níveis de glicose dos coelhos diabéticos. No entanto, percebeu-se que o grupo tratado com a mistura de flavonóides (G4) apresentou redução no teor médio de glicose mais cedo, a partir dos 21 dias, enquanto a redução apresentada pelo grupo tratado com a própolis (G3) aconteceu aos 35 dias. Isso levou a crer numa tendência da mistura de flavonóides em agir mais cedo em relação à própolis, no sentido de reduzir os níveis de glicose de coelhos hiperglicêmicos.

A semelhança, do ponto de vista estatístico, entre o grupo tratado com a mistura de flavonóides e o grupo tratado com a própolis pode ser devida ao fato de a própolis possuir flavonóides em sua constituição (GREENAWAY et al., 1990; TAZAWA et al., 1998), ou seja, os flavonóides podem ter sido os compostos responsáveis por essa tendência de redução dos níveis de glicose em coelhos hiperglicêmicos.

Mesmo que se atribua aos flavonóides essa tendência de redução de níveis elevados de glicose, não se deve desconsiderar o fato de que a própolis possui constituição complexa (GHISALBERTI, 1979). Logo, deve-se considerar a possibilidade de efeito sinérgico por parte dos inúmeros compostos químicos que fazem parte da constituição dessa resina natural.

Em muitos animais, tem-se induzido a diabete, utilizando para isso uma droga conhecida como estreptozocina (STZ), que estimula a produção de radicais livres que causam a destruição de células  $\beta$  pancreáticas (TURK et al., 1993; UCHIGATA et al., 1982; KANETO et al., 1995). No entanto, MATSUSHIGE et al. (1996) verificaram que o nível de indução de diabete em animais que se submeteram ao STZ era menor quando eles recebiam, previamente, extratos de própolis.

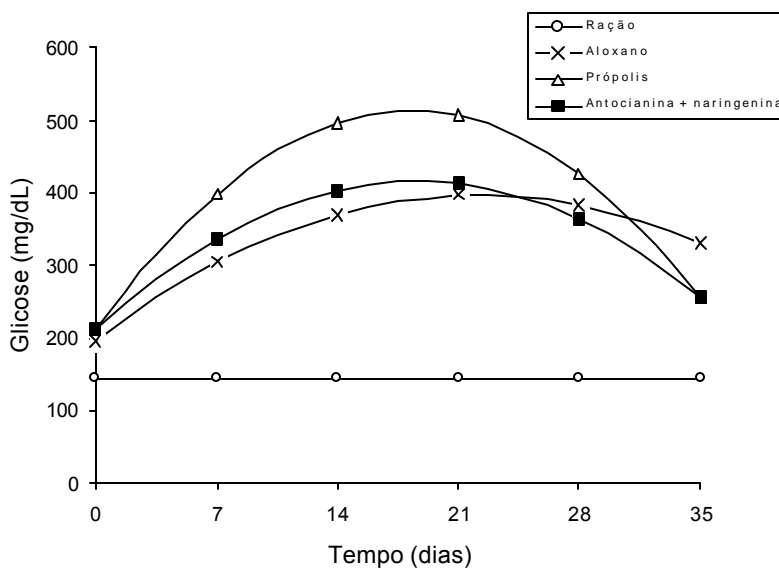
MATSUNO et al. (1997) extraíram um composto de uma própolis brasileira que foi denominado PRF-1. Eles demonstraram que tal substância

possuía propriedades antioxidantes e sugeriram que ela poderia ser utilizada no tratamento de doenças crônicas como a diabetes.

A Figura 3 auxilia na compreensão do Quadro 2. Ela indica claramente que o grupo G1 permaneceu praticamente constante em relação aos demais. Ela indica também que aos 35 dias os grupos-tratamento se encontravam com seus níveis de glicose abaixo do grupo-controle G2, o que evidencia a tendência dessas substâncias em reduzir o nível de glicose dos coelhos diabéticos utilizados neste modelo experimental.

#### 4.1.3. Efeitos das substâncias-teste no teor de triacilgliceróis

Os efeitos da própolis (em forma de comprimido de 150 mg) e de uma mistura de flavonóides (em forma de cápsulas contendo 10 mg de antocianinas e 10 mg de naringenina) no nível de triacilgliceróis foram avaliados em um modelo experimental, utilizando-se coelhos machos albinos da raça Nova Zelândia com hipertrigliceridemia induzida pela droga aloxano. Esses animais foram distribuídos em quatro grupos [G1 = (ração), G2 = (ração + aloxano), G3 = (ração + aloxano + própolis em forma de comprimido de 150 mg) e G4 = (ração + aloxano + mistura de flavonóides em cápsulas contendo 10 mg de antocianina + 10 mg de naringenina)], com seis animais cada um.



$$G1 = \text{ração: } \bar{Y} = 146,12 \text{ mg/dL}$$

$$G2 = \text{aloxano: } \hat{Y} = 197,4650 + 18,0933 \cdot T - 0,4088 \cdot T^2 \quad R^2 = 0,74$$

$$\begin{array}{l}
 \text{G3 = própolis: } \hat{Y} = 211,8170 + 33,1870T - 0,9119 * T^2 \quad R^2 = 0,77 \\
 \text{G4} \quad \quad \quad = \quad \quad \quad \text{antocianina} \quad \quad \quad + \quad \quad \quad \text{naringenina:} \\
 \hat{Y} = 211,0370 + 22,1038T - 0,5938 * T^2 \quad R^2 = 0,67
 \end{array}$$

Figura 3 – Estimativa da glicose de coelhos submetidos a diferentes dietas em função do tempo de avaliação.

No primeiro dia de experimento, foram dosados os níveis de triacilgliceróis no sangue dos coelhos, com o objetivo de verificar os níveis normais desse constituinte antes da aplicação do aloxano.

Aos sete dias foi realizada nova dosagem de triacilglicerol para se verificar a ocorrência de hipertrigliceridemia decorrente da aplicação do aloxano. Nesse mesmo tempo, iniciaram-se os tratamentos com as substâncias-teste.

Aos 14, 21, 28 e 35 dias, outras dosagens foram realizadas com o objetivo de verificar se houve algum efeito ocasionado pelas substâncias-teste nos animais com hipertrigliceridemia. Os dados coletados foram submetidos aos tratamentos estatísticos específicos, e os resultados obtidos estão apresentados no Quadro 3.

Quadro 3 – Triacilglicerol médio, em mg dL<sup>-1</sup>, e percentual de variação em relação aos grupos-controle, em %, de coelhos submetidos a diferentes tratamentos e avaliados durante 35 dias

Tempo (dias)	Grupo Tratado	Triacilglicerol (mg/dL)	Variação (%) em Relação a:	
			G1	G2
0	G1 = ração (R)	98,80 A	-	-
	G2 = R + aloxano	107,00 A	-	-
	G3 = R + aloxano + própolis	93,30 a	-	-
	G4 = R + aloxano + antocianina + naringenina	75,38 a	-	-
7	G1	86,73 B	-	-

	G2	370,98 A	-	-
	G3	373,70 a	+330,8 8	+0,73
	G4	434,58 a	+401,0 4	+17,14
14	G1	93,60 B	-	-
	G2	373,73 A	-	-
	G3	310,38 a	+231,6 0	-16,95
	G4	319,93 a	+241,8 1	-14,40
21	G1	102,87 B	-	-
	G2	370,48 A	-	-
	G3	230,67 a	+124,2 3	-37,74
	G4	279,38 a	+171,5 9	-24,59
28	G1	99,67 B	-	-
	G2	360,05 A	-	-
	G3	200,58 a	+101,2 4	-44,29
	G4	257,15 a	+158,0 0	-28,58
35	G1	102,48 B	-	-
	G2	353,27 A	-	-
	G3	182,48 a	+78,06	-48,35
	G4	255,93 a	+149,7 4	-27,55

---

Em cada tempo, A difere de B pelo teste F ( $P < 0,05$ ).  
Em cada tempo, a difere de b pelo teste F ( $P < 0,05$ ).

\* Estatisticamente diferente do controle pelo teste de Dunnett ( $P < 0,05$ ), em cada tempo.

No primeiro dia, observou-se que os animais dos grupos-controle (G1 e G2) eram estatisticamente semelhantes entre si. Tais resultados estão coerentes, pois, na dosagem do primeiro dia, os coelhos ainda não haviam recebido o aloxano.

Dos 7 aos 35 dias, verificou-se que os grupos-controle permaneceram estatisticamente diferentes entre si, com G2 possuindo níveis elevados de triacilgliceróis em relação a G1. Este é um resultado satisfatório, pois demonstra que a droga aloxano ocasionou hipertrigliceridemia nos animais.

A ocorrência de níveis elevados de triacilgliceróis em coelhos da raça Nova Zelândia devido à aplicação de aloxano foi observada também por HUANG et al. (1993). Essa alta concentração de triacilgliceróis no sangue deve-se ao fato de a droga ter provocado a destruição de células  $\beta$  do pâncreas (BONDY, 1969). Essas células são responsáveis pela produção do hormônio insulina (KRALL, 1983; LEHNINGER, 2000; LUCÍRIO e WUSTHOF, 2000), e a destruição delas no pâncreas resulta em severa e persistente redução da insulina sérica (GORRAY et al., 1986). Conseqüentemente, ocorrem alterações na atividade da enzima lipase lipoprotéica. Ela é responsável pela hidrólise dos triacilgliceróis em ácidos graxos e glicerol, influenciando a captação de triacilgliceróis no sangue pelo tecido adiposo (HOWARD, 1987). Na falta de insulina ou na ineficácia desta, a atividade da lipase fica comprometida, ocasionando acúmulo de triacilgliceróis no sangue (MAHAN e KRAUSE, 1994).

A hipertrigliceridemia também foi observada nos animais dos grupos G3 e G4 aos sete dias de ensaio. No entanto, ao se realizar o tratamento estatístico, observou-se que a indução de níveis elevados de triacilgliceróis nesses grupos não foi significativa.

Embora o teste de Dunnett tenha demonstrado que G3 e G4 não conseguiram se afastar significativamente do controle saudável G1, ao analisar atentamente o Quadro 3, percebeu-se que, aos sete dias, esses grupos-tratamento adquiriram níveis elevados de triacilgliceróis, com a ressalva de que

G3 passou de 93,30 mg/dL, no primeiro dia, para 373,70 mg/dL aos sete dias, e G4 passou de 75,38 mg/dL, no primeiro dia, para 434,58 mg/dL aos sete dias. Enquanto isso, o G1 praticamente não sofreu alteração, passando de 98,80 mg/dL, no primeiro dia, para 86,73 mg/dL aos 7 dias.

Quando foram observados os resultados obtidos aos 14, 21, 28 e 35 dias, verificou-se que os grupos-tratamento não tiveram redução nos níveis de triacilgliceróis a ponto de se afastar significativamente do grupo hipertrigliceridêmico (G2).

Mesmo que os resultados não sejam satisfatórios, do ponto de vista estatístico, biologicamente se pode deduzir que eles são promissores, pois, quando foi avaliado o Quadro 3, notou-se que a partir dos sete dias (quando se iniciaram os tratamentos com as substâncias) os níveis de triacilgliceróis, tanto de G3 quanto de G4, começaram a baixar e assim, permanecer até os 35 dias. O G3 reduziu de 373,70 mg dL<sup>-1</sup> aos sete dias para 182,48 mg dL<sup>-1</sup> aos 35 dias, e o G4 reduziu de 434,58 mg dL<sup>-1</sup> aos sete dias para 255,93 mg dL<sup>-1</sup> aos 35 dias. Enquanto isso, o nível de triacilgliceróis do grupo G2, que não recebeu as substâncias-teste, permaneceu praticamente constante, passando de 370,98 mg/dL aos sete dias para 353,27 mg/dL aos 35 dias. Além disso, com o passar dos períodos, os aumentos nos teores de triacilgliceróis nos grupos-tratamento em relação ao controle saudável (G1) foram se tornando cada vez menores.

Quando se aplicou o teste F ( $P < 0,05$ ) para comparar os grupos-tratamento entre si, observou-se que estes não se diferiram significativamente durante todo o ensaio, ou seja, tanto a própolis quanto a mistura de flavonóides exerceram efeito semelhante sobre os níveis de triacilgliceróis dos animais em tratamento. Essa semelhança, do ponto de vista estatístico, pode estar relacionada ao fato de a própolis possuir flavonóides em sua constituição, ou seja, os flavonóides contidos nessa substância podem ter sido os responsáveis pela redução dos níveis elevados de triacilgliceróis no sangue dos animais do grupo G3. No entanto, não se deve desconsiderar o fato de que a própolis possui, em sua constituição, diversos tipos de compostos químicos (GREENAWAY et al., 1991). Essa diversidade de substâncias indica que pode ter ocorrido efeito sinérgico.

Mesmo que os tratamentos, com a própolis e com a mistura de flavonóides, tenham proporcionado efeitos estatisticamente semelhantes, verifica-se, no Quadro 3, que o grupo tratado com a própolis apresentou certa vantagem em relação ao grupo tratado com a mistura de flavonóides. Aos 14 dias, o grupo G3 apresentou redução de 16,95%, enquanto o grupo G4 se reduziu 14,40%. Aos 21 dias, a redução em G3 foi de 37,74%, enquanto a de G4 foi menor (24, 59%). Aos 28 e 35 dias, a diferença de redução entre esses dois grupos se tornou ainda maior, sendo aos 35 dias de 48,35 e 27, 55% em G3 e G4, respectivamente. Isso indica ação mais eficaz por parte da própolis, em comparação com a mistura de flavonóides.

A redução de níveis elevados de triacilgliceróis, por parte dos flavonóides, verificada nesse modelo experimental, foi também observada em vários outros trabalhos. NAGEM et al. (1994), investigando a ação de diversos tipos de flavonóides, entre eles a naringenina, no metabolismo lipídico de ratos diabéticos, verificaram considerável redução de triacilgliceróis no sangue desses animais.

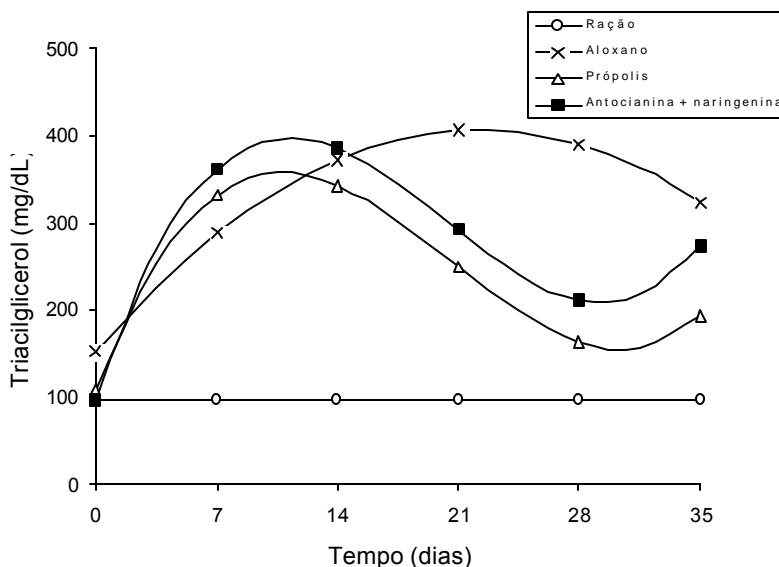
NAGEM et al. (1999), estudando os efeitos de alguns flavonóides, entre eles a antocianina, no metabolismo lipídico de ratos com hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia induzida por triton, verificaram redução estatisticamente significativa dos níveis de triacilgliceróis e colesterol, sobressaindo-se os tratamentos com naringina + antocianina e naringina + carmin, inclusive com efeitos sinérgicos.

LIMA (2000), analisando os efeitos farmacológicos dos flavonóides no metabolismo lipídico de coelhos com hipertrigliceridemia induzida por triton, verificou que o flavonóide bixina foi bastante eficiente na redução dos níveis elevados de triacilgliceróis nesses animais.

Em outro trabalho com coelhos hipertrigliceridêmicos, LOPES et al. (2000) verificaram que associação entre a naringenina e chitosan foi bastante eficiente em promover a redução de triacilgliceróis no sangue desses animais. O mesmo foi observado na associação entre naringina e antocianina.

Na Figura 4, demonstra-se claramente que ocorreram elevações nos níveis de triacilgliceróis nos grupos de animais que se submeteram ao aloxano, enquanto o grupo saudável permaneceu praticamente constante. Nessa figura, demonstra-se também que houve redução desses níveis nos grupos em

tratamento. Essa redução se tornou acentuada em torno dos 28 dias de experimento. Outro fato interessante, apresentado na Figura 7, é uma tendência de retorno ao aumento dos níveis triacilgliceróis, próximo dos 35 dias de experimento. Não se pode afirmar que esse crescimento continuaria após os 35 dias. Não foi encontrado na literatura fato semelhante.



G1 = ração:  $\bar{Y} = 97,36$  mg/dL

G2 = aloxano:  $\hat{Y} = 1534850 + 228196 \cdot T - 0,5126 \cdot T^2$   $R^2 = 0,78$

G3 = própolis:  $\hat{Y} = 1069600 + 525358 \cdot T - 3,2968 \cdot T^2 + 0,05336 \cdot T^3$   $R^2 = 0,90$

G4 = antocianina + naringenina:

$\hat{Y} = 97,4843 + 614238T - 3,7916 \cdot T^2 + 0,06228 \cdot T^3$   $R^2 = 0,82$

Figura 4 – Estimativa do triacilglicerol de coelhos submetidos a diferentes dietas em função do tempo de avaliação.

## 4.2. Segundo ensaio biológico

### 4.2.1. Efeitos das substâncias-teste no peso corporal

Os efeitos da própolis (em forma de cápsulas de 150 mg) e da antocianina (em forma de cápsulas de 20 mg) foram avaliados sobre o peso corporal de coelhos machos adultos da raça Nova Zelândia, que receberam a droga aloxano indutora de diabetes. Esses animais foram distribuídos em quatro

grupos [G5 = (ração), G6 = (ração + aloxano), G7 = (ração + aloxano + própolis em forma de cápsulas de 150 mg) e G8 = (ração + aloxano + antocianina em forma de cápsulas de 20 mg)], com seis repetições cada um.

No primeiro dia, realizou-se a pesagem dos animais para verificar quais eram os pesos normais deles antes de receber o aloxano.

Aos sete dias, nova pesagem foi realizada com o objetivo de verificar se ocorreu algum efeito da droga em relação ao peso corporal dos animais. Nesse mesmo tempo, iniciaram-se os tratamentos com as substâncias-teste.

Aos 14, 21, 28 e 35 dias, novas pesagens foram realizadas com o objetivo de verificar se houve algum efeito das substâncias-teste sobre o peso corporal dos animais. Os dados coletados foram submetidos aos tratamentos estatísticos específicos, e os resultados estão apresentados no Quadro 4.

Os resultados demonstraram que, mesmo antes da aplicação do aloxano, os grupos-controle (G5 e G6) já eram estatisticamente diferentes em massa corporal. Essa diferença persistiu até o final do experimento. No entanto, após a aplicação do aloxano, notou-se claramente que o controle saudável G5 apresentou ganho de peso, durante todo o ensaio, em relação ao controle G6. Essas informações indicaram claramente que a droga ocasionou a perda de peso nos animais do grupo G6. Essa perda de peso é característica de animais que se tornam diabéticos ao se submeterem à droga aloxano (GORRAY et al., 1986). De acordo com ARDUÍNO (1979), na diabete o paciente perde peso por causa, principalmente, do catabolismo das proteínas e da gordura do tecido adiposo. Ocorre, também, perda de glicose pela urina, que pode alcançar cifras de 10% com o correspondente desperdício calórico, e de desidratação decorrente da poliúria.

Quando foi comparado o grupo-tratamento G7 com o controle G5, percebeu-se que, durante todo o ensaio, esses dois grupos permaneceram praticamente semelhantes, do ponto de vista estatístico. No entanto, ao analisar atentamente o Quadro 4, notou-se que, após a aplicação do aloxano no grupo G7, o grupo saudável G5 aumentou de peso em relação a este, passando de 2,386 kg no primeiro dia para 3,053 kg aos 35 dias. O mesmo ocorreu na relação entre G8 e G5.

Quando foram comparados os grupos-tratamento (G7 e G8) com o controle G6, percebeu-se que tanto G7 quanto G8 se distanciaram

significativamente deste controle a partir do tempo 21. Ao observar as médias de peso, notou-se que, desde a aplicação do aloxano, o grupo G6 perdeu peso e os grupos-tratamento apresentaram certo ganho.

Quadro 4 – Peso médio, em kg, e percentual de variação em relação aos grupos-controle, em %, de coelhos submetidos a diferentes tratamentos e avaliados durante 35 dias

Tempo (dias)	Grupo Tratado	Peso (kg)	Variação (%) em Relação a:	
			G5	G6
0	G5 = ração (R)	2,386 A	-	-
	G6 = R + aloxano	1,892 B	-	-
	G7 = R + aloxano + própolis	2,324 a	-	-
	G8 = R + aloxano + antocianina	2,404 a	-	-
7	G5	2,622 A	-	-
	G6	1,858 B	-	-
	G7	2,279 a	-13,08	+22,66
	G8	2,362 a	-9,92	+27,13
14	G5	2,758 A	-	-
	G6	1,814 B	-	-
	G7	2,438 a	-11,60	+34,40
	G8	2,368 a	-14,14	+30,54
21	G5	2,899 A	-	-
	G6	1,773 B	-	-
	G7	2,486 a	-14,25	+40,21 *
	G8	2,505 a	-13,59	+41,29 *
28	G5	2,966 A	-	-
	G6	1,730 B	-	-
	G7	2,589 a	-12,71	+49,65 *
	G8	2,538 a	-14,43	+46,71 *

35	G5	3,053 A	-	-
	G6	1,682 B	-	-
	G7	2,564 a	-16,02	+52,44 *
	G8	2,541 a	-16,77	+51,07 *

Em cada tempo, A difere de B pelo teste F ( $P < 0,05$ ).

Em cada tempo, a difere de b pelo teste F ( $P < 0,05$ ).

\* Estatisticamente diferente do controle pelo teste de Dunnett ( $P < 0,05$ ), em cada tempo.

Os resultados indicaram que as substâncias-teste não impediram o distanciamento significativo dos grupos-tratamento em relação ao controle saudável G5. A própolis e a antocianina fizeram, também, com que tanto G7 quanto G8 tivessem ganho de peso estatisticamente significativo em relação ao grupo G6.

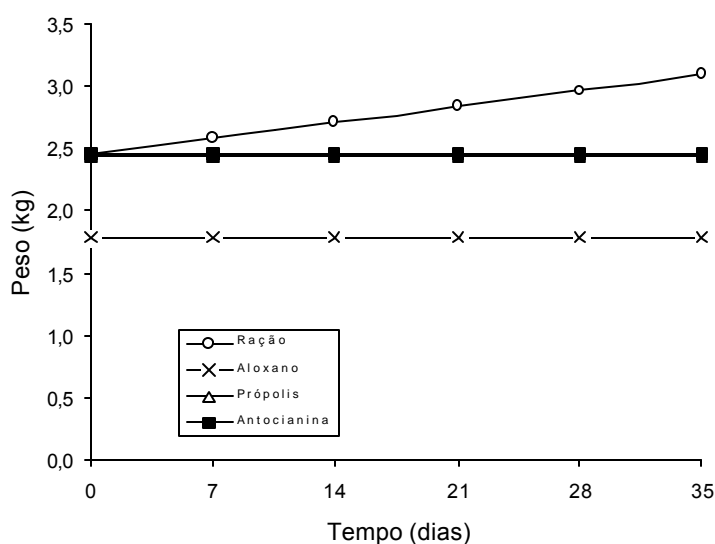
O teste F ( $P < 0,05$ ) revelou que tanto a antocianina quanto a própolis tiveram o mesmo efeito sobre o peso corporal dos animais em tratamento. Essa similaridade pode ser devida ao fato de a própolis possuir flavonóides em sua constituição (VILLANUEVA et al., 1970). Os flavonóides poderiam ser os responsáveis por impedir queda de peso por parte dos grupos-tratamento. Não se deve ignorar, porém, que a própolis possui constituição complexa e que as inúmeras substâncias químicas que compõem essa resina natural podem ter agido, sinergicamente, no peso corporal desses animais.

Mesmo não tendo realizado procedimentos estatísticos para se comparar o tratamento com a própolis em comprimido (no primeiro ensaio) com o tratamento com a mesma em cápsulas (no segundo ensaio), pode-se especular que o fato de a própolis em comprimido ter proporcionado melhores resultados do que a em cápsulas está relacionado com as vias de absorção. As substâncias (que compõem a própolis) presentes no comprimido podem ter sofrido modificações no pH ácido estomacal, levando a mudanças nas suas estruturas e tomando-as mais ativas. Em contrapartida, essas alterações não devem ter ocorrido na própolis em cápsula, pois ela fica protegida do pH estomacal.

Nesse ensaio, a antocianina isolada parece não ter sido tão eficiente quanto a antocianina associada com naringenina, no primeiro ensaio, na

recuperação de peso dos animais. A associação dos dois flavonóides no ensaio anterior pode ter ocasionado efeito sinérgico positivo, dando resultados mais atraentes do que no segundo ensaio.

Embora a Figura 5 tenha representado relação praticamente semelhante entre os tratamentos (com as retas sobrepostas) e o controle G6, no Quadro 4, por sua vez, demonstrou-se que os grupos-tratamento tiveram ganho de peso em relação a esse controle. Essa figura ilustra, também, a relação entre os controles, em que G5 ganhou peso em relação ao G6.



$$G1 = \text{ração: } \hat{Y} = 2,4585 + 0,01841 \cdot T \quad R^2 = 0,96$$

$$G2 = \text{aloxano: } \bar{Y} = 1,792 \text{ kg}$$

$$G3 = \text{própolis: } \bar{Y} = 2,447 \text{ kg}$$

$$G4 = \text{antocianina: } \bar{Y} = 2,453 \text{ kg}$$

Figura 5 – Estimativa do peso de coelhos submetidos a diferentes dietas em função do tempo de avaliação.

#### 4.2.2. Efeitos das substâncias-teste no teor de glicose

Foi montado um modelo experimental que teve como finalidade avaliar os efeitos da própolis (em forma de cápsulas de 150 mg) e da antocianina (em forma de cápsulas de 20 mg) no nível de glicose sanguínea de coelhos machos

albinos da raça Nova Zelândia com hiperglicemia induzida pela droga aloxano. Os animais foram distribuídos em quatro grupos [G5 = (ração), G6 = (ração + aloxano), G7 = (ração + aloxano + própolis em forma de cápsulas de 150 mg) e G8 = (ração + aloxano + antocianina em forma de cápsulas de 20 mg)], com seis repetições cada um.

No primeiro dia, realizou-se a dosagem de glicose com a finalidade de verificar quais eram as concentrações normais desse açúcar no sangue dos coelhos antes da aplicação da droga aloxano.

Aos sete dias, realizaram-se novas dosagens de glicose com o objetivo de verificar se houve indução de diabetes nos coelhos dos grupos G6, G7 e G8. Nesse mesmo tempo, iniciaram-se os tratamentos com as substâncias-teste.

Aos 14, 21, 28 e 35 dias, novas dosagens foram realizadas com a finalidade de verificar se as substâncias-teste ocasionaram algum efeito sobre os níveis de glicose dos coelhos. Os dados obtidos foram submetidos a tratamentos estatísticos específicos, e os resultados estão apresentados no Quadro 5.

Ao analisar atentamente o Quadro 5, notou-se que, após a aplicação da droga aloxano, os grupos-controle (G5 e G6) apresentaram diferenças significativas entre si, persistindo, assim, até o final do ensaio. Isso indica que o objetivo de se induzir a diabetes foi atingido.

Assim como no experimento desta pesquisa, em outros trabalhos vários pesquisadores conseguiram induzir a diabetes em animais experimentais, utilizando a droga aloxano. FRINHANI (1998), por exemplo, induziu diabetes em ratos, aplicando o aloxano, via intravenosa, numa dose de 60 mg/kg de peso corporal dos animais. Em outro modelo experimental, MOHANAN e BOSE (1981) induziram diabetes em ratos por injeção intraperitoneal de aloxano em uma dose de 100 mg/100 g de peso corporal. Já MARCIANO (1997) testou diferentes concentrações de aloxano para induzir diabetes experimental em ratos. De acordo com esse pesquisador, o sucesso na indução da hiperglicemia foi obtido com a dosagem de 60 mg de aloxano por quilograma de peso corporal dos ratos.

Analisando também a relação entre os grupos-tratamento (G7 e G8) e o controle G5, verificou-se que, após a aplicação do aloxano, houve distanciamento significativo entre eles. Mesmo após a administração das

substâncias, essa diferença não diminuiu significativamente, persistindo até o final do ensaio.

Embora, do ponto de vista estatístico, os grupos tratados com as substâncias-teste não tenham conseguido se aproximar do grupo saudável G5, notou-se claramente que houve redução no teor de glicose desses grupos. Essa idéia foi mais bem compreendida quando se observou que, aos 35 dias, os tratamentos se afastaram significativamente do grupo G6 diabético. O grupo G7 passou de 581,20 mg dL<sup>-1</sup> aos sete dias para 307,02 mg dL<sup>-1</sup> aos 35 dias e o G8, de 640,77 mg dL<sup>-1</sup> aos sete dias para 338,35 mg dL<sup>-1</sup> aos 35 dias. Nesse mesmo período, o controle diabético se manteve praticamente constante.

Quadro 5 – Glicose média, em mgdL<sup>-1</sup>, e percentual de variação em relação aos grupos-controle, em %, de coelhos submetidos a diferentes tratamentos e avaliados durante 35 dias

Tempo (dias)	Grupo Tratado	Glicose (mg/dL)	Variação (%) em Relação a:	
			G5	G6
0	G5= ração (R)	148,17 A	-	-
	G6= R + aloxano	135,73 A	-	-
	G7= R + aloxano + própolis	141,70 a	-	-
	G8= R + aloxano + antocianina	152,65 a	-	-
7	G5	150,47 B	-	-
	G6	537,70 A	-	-
	G7	581,20 a	+286,26	+8,09
	G8	640,77 a	+325,85	+19,17
			*	
14	G5	154,85 B	-	-
	G6	526,18 A	-	-
	G7	530,05 a	+242,30	+0,74
	G8	551,35 a	+256,05	+4,78
			*	
21	G5	148,27 B	-	-

	G6	511,38 A	-	-
	G7	498,55 a	+236,24	-2,51
			*	
	G8	476,45 a	+221,34	-6,83
			*	
28	G5	146,00 B	-	-
	G6	508,45 A	-	-
	G7	460,43 a	+215,36	-9,44
			*	
	G8	412,12 a	+182,27	-18,95
			*	
35	G5	147,57 B	-	-
	G6	509,17 A	-	-
	G7	307,02 a	+108,05	-39,70 *
			*	
	G8	338,35 a	+129,28	-33,55 *
			*	

Em cada tempo, A difere de B pelo teste F ( $P < 0,05$ ).

Em cada tempo, a difere de b pelo teste F ( $P < 0,05$ ).

\* Estatisticamente diferente do controle pelo teste de Dunnett ( $P < 0,05$ ), em cada tempo.

Apesar de o teste F ( $P < 0,05$ ) não ter acusado diferença entre os tratamentos, observou-se certa tendência de o tratamento com antocianina ser mais eficiente do que o tratamento com a própolis. Tal fato foi comprovado ao se analisar o Quadro 5, percebendo-se que, aos 21 dias, o grupo tratado com a própolis apresentou redução de 2,51% em seu teor médio de glicose, enquanto no grupo tratado com antocianina essa redução foi de 6,83%. Aos 28 dias, o grupo G7 exibiu redução de 9,44% abaixo dos 18,95% apresentados pelo grupo da antocianina. Somente aos 35 dias é que o grupo tratado com a própolis conseguiu superar o grupo G8, apresentando redução de 39,70% um pouco acima dos 33,55% mostrados pelo grupo da antocianina. Notou-se,

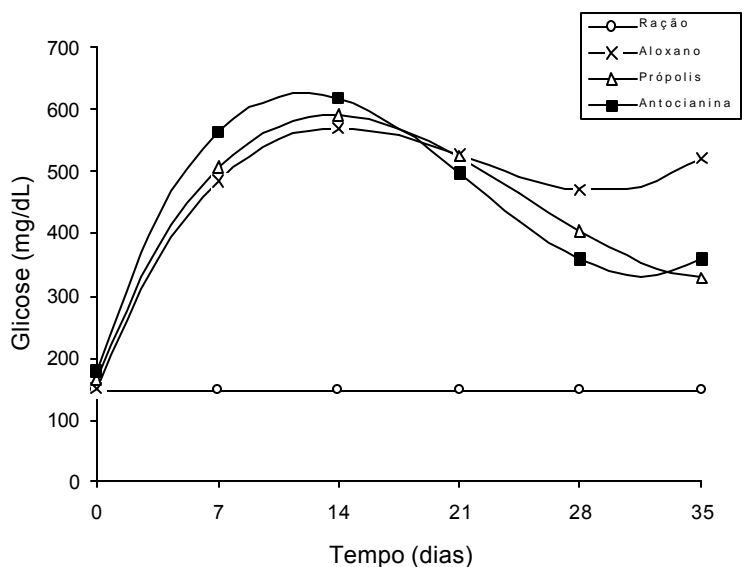
então, que o grupo da antocianina surtiu melhor efeito desde os 21 dias, enquanto o grupo da própolis teve melhor resultado somente aos 35 dias.

Em outro trabalho, FRINHANI (1998), ao investigar os efeitos de antocianinas de uvas roxas e de *Tradescantia pallida* nos níveis de glicose de ratos diabéticos, verificou que, num período de 21 dias de experimento, essas substâncias conseguiram reduzir, consideravelmente, os níveis de glicose desses animais no décimo quarto dia de tratamento.

Na Figura 6, demonstra-se como as curvas dos grupos-tratamento ficaram abaixo da curva do controle diabético mais ou menos a partir dos 21 dias. Ela indica também que, em torno desse mesmo período, a curva que representa o grupo tratado com a antocianina passa a ficar abaixo da que representa o grupo tratado com própolis. Somente aos 35 dias é que as posições se invertem. Nessa figura, demonstra-se também que, em torno dos 35 dias, as curvas dos grupos G6, G7 e G8 apresentaram tendência de retorno ao crescimento. Para esse fato ter sido mais bem compreendido, era preciso que o experimento tivesse tido período maior de duração. Não há como especular o que aconteceria após os 35 dias de experimento.

#### **4.2.3. Efeitos das substâncias-teste no teor de triacilgliceróis**

Os efeitos da própolis em forma de cápsulas de 150 mg e da antocianina, também em forma de cápsulas de 20 mg, foram avaliados sobre o nível de triacilgliceróis no sangue de coelhos machos albinos da raça Nova Zelândia com hipertrigliceridemia induzida pela droga aloxano. Esses animais



G5 = ração:  $\bar{Y} = 149,22 \text{ mg/dL}$

G6 = aloxano:  $\hat{Y} = 152,1530 + 70,9739 \cdot T - 3,7389 \cdot T^2 + 0,05753 \cdot T^3 \quad R^2 = 0,94$

G7 = própolis:  $\hat{Y} = 165,6090 + 71,4970T - 3,6095 \cdot T^2 + 0,04854 \cdot T^3 \quad R^2 = 0,89$

G8 = antocianina:  $\hat{Y} = 176,8090 + 86,4990T - 4,9962 \cdot T^2 + 0,07636 \cdot T^3 \quad R^2 = 0,90$

Figura 6 – Estimativa da glicose de coelhos submetidos a diferentes dietas em função do tempo de avaliação.

foram distribuídos em quatro grupos [G5 = (ração), G6 = (ração + aloxano), G7 = (ração + aloxano + própolis em forma de cápsulas de 150 mg) e G8 = (ração + aloxano + antocianina em forma de cápsulas de 20 mg)], sendo cada grupo composto por seis animais.

Este modelo experimental teve duração de 35 dias, com a ressalva de que:

- No primeiro dia, foi realizada a dosagem de triacilgliceróis para se verificar o nível normal destes no sangue dos animais antes da aplicação do aloxano; logo após a dosagem, aplicou-se a droga nesses coelhos.
- Aos sete dias, novas dosagens foram realizadas com o objetivo de verificar a ocorrência de algum efeito sobre os níveis de triacilgliceróis dos

animais submetidos ao aloxano. Nesse mesmo período, deu-se início ao tratamento com as substâncias-teste.

- Aos 14, 21, 28 e 35 dias, novas dosagens foram realizadas com a finalidade de verificar se as substâncias-teste ocasionaram algum efeito sobre os níveis de triacilgliceróis nos animais que se submeteram a esse tratamento com aloxano.

- Tratamentos estatísticos foram aplicados aos dados coletados, cujos resultados obtidos estão no Quadro 6.

Ao observar o Quadro 6, percebe-se que os grupos-controle (G5 e G6) passaram a se diferenciar significativamente aos sete dias após a aplicação do aloxano; persistiram estatisticamente diferentes até o final do ensaio. Nesse período, notou-se que o grupo-controle saudável G5 se manteve praticamente constante em seu nível baixo de triacilgliceróis, apresentando concentração de 90,82 mg/dL aos sete dias e 88,02 mg/dL aos 35 dias. Enquanto isso, o grupo G6 permaneceu praticamente constante em seu nível elevado de triacilgliceróis, com uma concentração de 500,13 mg/dL aos sete dias e 443 mg/dL aos 35 dias. Esses resultados indicaram claramente que se conseguiu induzir a hipertrigliceridemia nos animais submetidos ao aloxano. Essa indução também foi observada nos animais dos grupos-tratamento (G7 e G8).

A hipertrigliceridemia ocorre porque os animais se tornam diabéticos ao serem submetidos ao aloxano, que lhes provoca redução da insulina sérica. A falta deste hormônio ocasiona alterações na atividade da lipase, enzima envolvida com os níveis de triacilgliceróis no sangue. Assim, com sua atividade comprometida, esses níveis tendem a tornar-se elevados (ABBATE e BRUNAEL, 1990).

Aos 14 dias, o grupo tratado com antocianina apresentou redução de 5,03% no nível médio de triacilglicerol em relação ao grupo que não recebeu tratamento com as substâncias-teste (G6).

Aos 21 dias, o grupo da antocianina apresentou queda no seu nível de triacilgliceróis de 23,82% em relação ao controle G6. Mesmo assim, não se aproximou, de maneira significativa, do grupo saudável G5.

Aos 28 dias, tanto o grupo da própolis quanto o da antocianina apresentaram reduções no nível médio de triacilgliceróis em relação ao controle G6, de 13,62 e 43,65%, respectivamente. Com isso, o grupo da

antocianina se aproximou consideravelmente do grupo-controle saudável G5, o que não foi possível ao grupo da própolis. Ambos não se afastaram significativamente do controle doente G6.

Quadro 6 – Triacilglicerol médio, em mg dL<sup>-1</sup>, e percentual de variação em relação aos grupos-controle, em %, de coelhos submetidos a diferentes tratamentos e avaliados durante 35 dias

Tempo (dias)	Grupo Tratado	Triacilglicerol (mg/dL)	Variação (%) em Relação a:	
			G5	G6
0	G5 = ração (R)	89,40 A	-	-
	G6 = R + aloxano	98,02 A	-	-
	G7 = R + aloxano + própolis	117,35 a	-	-
	G8 = R + aloxano + antocianina	111,25 a	-	-
7	G5	90,82 B	-	-
	G6	500,13 A	-	-
	G7	713,83 a	+685,87	+42,71
			*	
	G8	556,83 a	+513,11	+11,34
			*	
14	G5	87,05 B	-	-
	G6	474,32 A	-	-
	G7	534,18 a	+513,65	+12,62
			*	
	G8	450,47 a	+417,48	-5,03
			*	
21	G5	88,77 B	-	-
	G6	461,22 A	-	-
	G7	479,75 a	+440,44	+4,02
			*	
	G8	351,35 a	+295,80	-23,82
			*	

28	G5	87,45 B	-	-
	G6	454,02 A	-	-
	G7	392,20 a	+348,48	-13,62
			*	
	G8	255,85 a	+192,57	-43,65
35	G5	88,02 B	-	-
	G6	443,22 A	-	-
	G7	298,75 a	+239,41	-32,60
	G8	175,12 a	+98,95	-60,49
			*	

Em cada tempo, A difere de B pelo teste F ( $P < 0,05$ ).

Em cada tempo, a difere de b pelo teste F ( $P < 0,05$ ).

\* Estatisticamente diferente do controle pelo teste de Dunnett ( $P < 0,05$ ), em cada tempo.

Aos 35 dias, o grupo da antocianina apresentou redução considerável de 60,49%. Essa redução fez com que este grupo se tornasse ainda mais semelhante ao grupo saudável e diferente do grupo-controle doente G6. Já o grupo tratado com a própolis, mesmo tendo apresentado redução de 32,60%, não conseguiu se aproximar, consideravelmente, do grupo-controle saudável nem se afastar, de maneira significativa, do grupo doente G6.

Os resultados apresentados pelo grupo G8 evidenciaram que a antocianina foi eficiente em reduzir os níveis de triacilglicéóis em coelhos com hipertrigliceridemia induzida por aloxano e que a redução se tornou significativa aos 35 dias de experimento.

Os resultados apresentados pelo grupo tratado com a própolis não foram estatisticamente consideráveis. No entanto, percebeu-se claramente tendência desta substância em reduzir o elevado nível de triacilglicéóis dos animais com ela tratados. Isso foi mais bem compreendido quando se observou a redução que o grupo G7 apresentou de 713,83 mg/dL aos sete dias para 298,75 mg/dL aos 35 dias, ao passo que o grupo-controle diabético G6 permaneceu praticamente constante. Pode-se dizer, então, que aumento no

tempo do experimento, ou até mesmo na dosagem da própolis ou os dois fatores combinados, poderia levar a resultados mais satisfatórios.

Quando foram comparados, pelo teste F ( $P < 0,05$ ), os grupos-tratamento entre si, verificou-se que, do ponto de vista estatístico, as substâncias provocaram efeito semelhante, no sentido de reduzir os níveis de triacilgliceróis dos animais com hipertrigliceridemia. No entanto, observou-se tendência da antocianina em ser mais eficiente do que a própolis. Esta substância atuou mais cedo (aos 14 dias) do que a própolis (aos 28 dias). Durante todos esses períodos, a antocianina provocou reduções maiores do que a própolis. A diferença mais considerável foi aos 35 dias, quando a antocianina promoveu redução de 60,49%, sendo esta, praticamente, o dobro da ocasionada pela própolis, que foi de 32,60%.

JAHROMI e RAY (1993) verificaram redução considerável do nível de triacilgliceróis provocada pelo flavonóide liquiritigenina, em animais experimentais com hipertrigliceridemia. Já SUDHEESH et al. (1997) verificaram que os flavonóides extraídos da fruta *Solanum melongena*, conhecida popularmente como berinjela, eram eficientes no combate à hiperlipidemia, quando administrados em ratos hiperlipidêmicos, numa dosagem de 1 mg/100 g de peso corporal/dia. BOK et al. (1999), estudando os efeitos da mistura de dois flavonóides (naringina + hesperidina) em ratos machos, verificaram redução considerável no nível de triacilgliceróis do fígado.

A redução dos níveis elevados de triacilgliceróis em diabéticos é importante, uma vez que nesses doentes o metabolismo da glicose e dos triacilgliceróis é bastante alterado. Indivíduos diabéticos possuem níveis muito reduzidos do hormônio insulina. Este hormônio auxilia a captura de ácidos graxos livres, na corrente sangüínea, pelo tecido adiposo. Na falta da insulina, os ácidos graxos livres se acumulam na corrente sangüínea. A falta de insulina influencia a ocorrência da hipertrigliceridemia (MAHAN e KRAUSE, 1994), que aumenta o risco de ocorrência de doença arterial coronária. Essas doenças coronárias são as principais responsáveis pelas mortes dos indivíduos portadores de diabete (PYORAL et al., 1987; STAMLER et al., 1993).

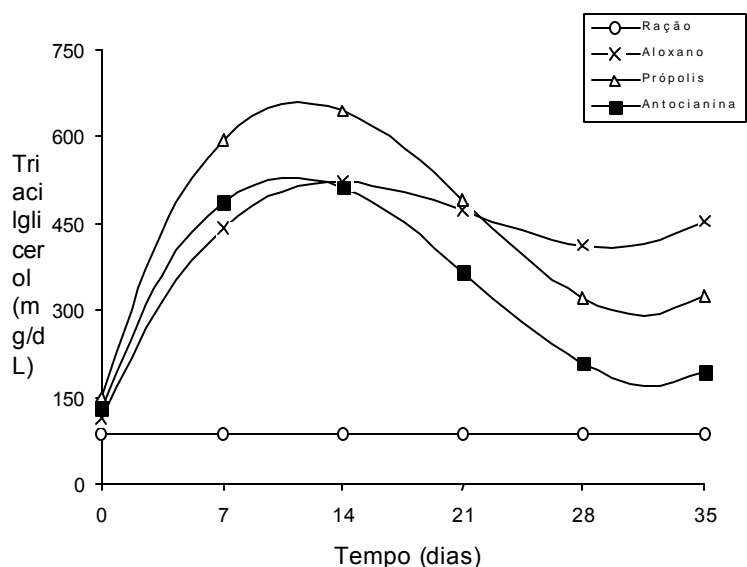
Na Figura 7, demonstra-se que a curva relacionada com grupo tratado com antocianina ficou abaixo do controle diabético G6 a partir dos 14 dias de

experimento, o que ocorreu com a curva da própolis, somente a partir dos 21 dias.

Essas curvas evidenciam, também, uma tendência de retorno ao crescimento em torno dos 35 dias. No entanto, seria preciso um período maior de experimento para verificar se esse aumento perduraria. Não se pode especular o que aconteceria após os 35 dias de duração desse ensaio.

### 4.3. Terceiro ensaio biológico (ensaio toxicológico)

Neste ensaio foram investigados os possíveis efeitos tóxicos das substâncias testadas nos dois ensaios anteriores sobre peso corporal e metabolismos mineral, lipídico, protéico e de carboidratos de coelhos saudáveis, machos albinos da raça Nova Zelândia. Estes animais foram distribuídos em cinco grupos [G9= (ração), G10= (ração + talco farmacêutico em forma de cápsula de 100 mg), G11= (ração + própolis em forma de cápsulas de 150 mg), G12= (ração + antocianina em forma de cápsulas de 10 mg) e G13= (ração + a mistura de flavonóides contendo 10 mg de antocianina + 10 mg de naringenina)], cada grupo composto de seis animais.



Ração:  $\bar{Y} = 88,59 \text{ mg/dL}$

Aloxano:  $\hat{Y} = 115,8600 + 69,8884 * T - 3,7032 * T^2 + 0,05672 * T^3$   $R^2 = 0,93$

Própolis:  $\hat{Y} = 153,4960 + 100,0130T - 5,9067 * T^2 + 0,09112 * T^3$   $R^2 = 0,84$

Antocianina:  $\hat{Y} = 133,1140 + 81,3771T - 4,9436 * T^2 + 0,07620 * T^3$   $R^2 = 0,92$

Figura 7 – Estimativa do triacilglicerol de coelhos submetidos a diferentes dietas em função do tempo de avaliação.

Foi incluído um grupo que recebeu talco farmacêutico (trissilicato de magnésio), utilizado como veículo no preparo de medicamentos em cápsulas. A finalidade da inclusão desse grupo foi verificar se o talco provoca algum efeito adverso no peso corporal e no metabolismo de animais saudáveis. O período de duração desse modelo experimental foi de 30 dias, sendo aos 0, 15 e 30 dias medido o peso corporal e dosados alguns constituintes do sangue desses animais. Os dados coletados foram submetidos a tratamentos estatísticos específicos, que forneceram os resultados apresentados nos tópicos subseqüentes:

#### **4.3.1. Efeitos das substâncias-teste no peso corporal**

A análise do Quadro 7 revelou que durante todo o terceiro ensaio não houve diferenças significativas entre os grupos-controle (G9 e G10). Isso foi verificado pelo teste F, ou seja, o talco farmacêutico que foi administrado no grupo G10 não causou nenhuma alteração no peso dos animais deste grupo. Tais resultados são satisfatórios, já que a única função do talco é completar o volume das cápsulas, não devendo interferir no metabolismo do usuário.

Quando compararam os grupos-tratamento (G11, G12 e G13) com os grupos-controle, pelo teste de Dunnett, verificou-se que, durante todo o terceiro ensaio, esses grupos não se diferenciaram significativamente. Pode-se concluir, com isso, que as substâncias não causaram nenhum efeito significativo sobre o peso corporal dos animais.

FRINHANI (1998), em experimento realizado com ratos saudáveis, avaliando os efeitos das antocianinas de uvas roxas e de *Tradescantia pallida*

no peso corporal desses animais, não observou efeitos adversos consideráveis.

A perda de peso corporal pode ser decorrente de vários distúrbios metabólicos, dentre eles se podem citar níveis muito elevados de glicose no sangue (ODETTI et al., 1990; OSOL, s.d.), deficiência de vitamina B<sub>12</sub>, desidratação (SWENSON, 1988) etc. Isso leva a crer que as substâncias, nas dosagens aqui utilizadas, não provocaram nenhum distúrbio metabólico relacionado à perda de peso.

#### 4.3.2. Efeitos das substâncias-teste no teor de glicose

A análise do Quadro 8 indicou que, durante todo o ensaio toxicológico, não houve diferença significativa entre os grupos-controle (G9 e G10), ou seja, o talco farmacêutico não influenciou o teor de glicose do sangue dos animais.

Aos 15 e 30 dias, observou-se que o grupo tratado com a própolis apresentou redução de 25,69 e 23,96%, respectivamente, em teor médio de glicose, em relação ao grupo tratado com talco. Essas reduções foram consideradas estatisticamente relevantes, do ponto de vista estatístico. Porém, as reduções apresentadas por este grupo em relação ao grupo que recebeu

Quadro 7 – Peso médio, em kg, e percentual de variação em relação aos grupos-controle, em %, de coelhos submetidos a diferentes tratamentos e avaliados durante 30 dias

Tempo (dias)	Grupo Tratado	Peso (kg)	Variação em Relação a:	
			G9	G10
0	G9 = ração (R)	1,188 A	-	-
	G10 = R + talco farmacêutico	1,204 A	-	-
	G11 = R + própolis	1,178 a	-	-
	G12 = R + antocianina	1,223 a	-	-
	G13 = R + antocianina + naringenina	1,169 a	-	-
15	G9	1,471 A	-	-
	G10	1,468 A	-	-

	G11	1,421 a	-3,40	-3,20
	G12	1,497 a	+1,77	+1,98
	G13	1,348 a	--8,36	-8,17
30	G9	2,052 A	-	-
	G10	2,024 A	-	-
	G11	1,939 a	-5,51	-4,20
	G12	2,067 a	+0,73	+2,12
	G13	1,842 a	-10,23	-8,99

Em cada tempo, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ ).

Em cada tempo, A difere de B pelo teste F ( $P < 0,05$ ).

\* Estatisticamente diferente do controle pelo teste de Dunnett ( $P < 0,05$ ), em cada tempo.

Quadro 8 – Glicose média, em mg dL<sup>-1</sup>, e percentual de variação em relação aos grupos-controle, em %, de coelhos submetidos a diferentes tratamentos e avaliados durante 30 dias

Tempo (dias)	Grupo Tratado	Glicose (mg/dL)	Variação em Relação a:	
			G9	G10
0	G9 = ração (R)	145,13 A	-	-
	G10 = R + talco farmacêutico	166,93 A	-	-
	G11 = R + própolis	128,82 a	-	-
	G12 = R + antocianina	137,15 a	-	-
	G13 = R + antocianina + naringenina	132,45 a	-	-
15	G9	147,57 A	-	-
	G10	167,88 A	-	-
	G11	124,75 a	-15,46	-25,69 *
	G12	138,18 a	-6,36	-17,69
	G13	130,50 a	-11,57	-22,27
30	G9	144,47 A	-	-
	G10	165,73 A	-	-
	G11	126,02 a	-12,77	-23,96 *
	G12	138,50 a	-4,13	-16,43
	G13	132,18 a	-8,51	-20,24

Em cada tempo, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ ).

Em cada tempo, A difere de B pelo teste F ( $P < 0,05$ ).

\* Estatisticamente diferente do controle pelo teste de Dunnett ( $P < 0,05$ ), em cada tempo.

somente ração (G9) não foram consideradas estatisticamente relevantes. Isso indica que, apesar de a própolis ter ocasionado certa redução nos teores médios de glicose desses animais experimentais, essa redução não pode ser considerada significativa, do ponto de vista estatístico.

Com relação ao grupo tratado com antocianina e, também, ao tratado com antocianina + naringenina, as reduções apresentadas por esses grupos aos 15 e 30 dias foram consideradas irrelevantes, do ponto de vista estatístico.

O metabolismo de carboidratos é freqüentemente acompanhado pela determinação de glicose sangüínea. Muitos fatores podem afetar os níveis de glicose no sangue, dentre os quais se podem citar fatores de ordem genética, idade e obesidade (LUCÍRIO e WHUSTHOF, 2000).

A hiperglicemia pode ocorrer na diabete, assim como hipertireoidismo, choque traumático, traumatismo craniano, pancreatite aguda etc. Já a hipoglicemia pode ser observada em esforço muscular exagerado, hipotireoidismo, distúrbios de absorção intestinal, tratamento desordenado com insulina ou hipoglicemiantes orais, anorexia nervosa etc. Além disso, indivíduos hipoglicêmicos podem apresentar fome exagerada, nervosismo, desmaios e convulsões (OSOL, s.d.). Desse modo, pode-se concluir que, nas dosagens testadas, as substâncias-teste não provocaram patologias relacionadas com distúrbios no metabolismo de carboidratos, já que não se observaram alterações que pudessem ocasionar hiper ou hipoglicemia nos animais utilizados nesse ensaio. Os níveis normais de glicose não foram alterados significativamente por essas substâncias-teste.

As reduções ocorridas nos níveis de glicose dos grupos G11, G12 e G13, embora não sejam significativas, do ponto de vista estatístico, reforçam a idéia de que as substâncias-teste podem ser utilizadas no tratamento da hiperglicemia, uma vez que nos dois ensaios anteriores essas substâncias evidenciaram a mesma tendência de reduzir níveis de glicose.

#### 4.3.3. Efeito das substâncias-teste no teor de colesterol total

A análise do Quadro 9 revelou que, durante todo o ensaio toxicológico, os grupos G9 e G10 não se divergiram estatisticamente, em relação aos níveis de colesterol total. Isso demonstra que o talco farmacêutico não influenciou os níveis normais de colesterol total dos animais.

Quadro 9 – Colesterol total médio, em mg dL<sup>-1</sup>, e percentual de variação em relação aos grupos-controle, em %, de coelhos submetidos a diferentes tratamentos e avaliados durante 30 dias

Tempo (dias)	Grupo Tratado	Colesterol Total (mg/dL)	Variação em Relação a:	
			G9	G10
0	G9 = ração (R)	92,12 A	-	-
	G10 = R + talco farmacêutico	88,73 A	-	-
	G11 = R + própolis	75,92 a	-	-
	G12 = R + antocianina	91,08 a	-	-
	G13 = R + antocianina + naringenina	111,32 a	-	-
15	G9	90,20 A	-	-
	G10	89,68 A	-	-
	G11	73,88 a	-18,09	-17,62
	G12	91,22 a	+1,13	+1,72
	G13	111,92 a	+24,08	+24,80
30	G9	90,07 A	-	-
	G10	90,02 A	-	-
	G11	74,42 a	-17,38	-17,33
	G12	91,33 a	+1,40	+1,46
	G13	112,02 a	+24,37	+24,44

Em cada tempo, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula não diferem entre si, pelo teste de Tukey (P>0,05).

Em cada tempo, A difere de B pelo teste F (P<0,05).

\* Estatisticamente diferente do controle pelo teste de Dunnett (P<0,05), em cada tempo.



Aos 15 dias, observou-se redução de 18,09% no teor de colesterol total no grupo de animais tratados com própolis, em relação ao grupo tratado com ração. Aos 30 dias, essa redução foi de 17,38%. No entanto, tais diminuições foram consideradas irrelevantes, do ponto de vista estatístico.

O grupo tratado com antocianina e o com a mistura de flavonóides (antocianina + naringenina) não tiveram seus níveis de colesterol total alterados de forma significativa. Logo, esses resultados indicam claramente que essas substâncias não ocasionaram distúrbios no metabolismo de colesterol dos animais deste modelo experimental.

O colesterol é originário da dieta e da síntese pelo organismo; é precursor dos ácidos biliares e dos hormônios esteroidais. Além disso, faz parte da constituição da mielina dos tecidos nervosos. Assim, é importante que se mantenham os níveis normais de colesterol total (STRYER, 1996; SWENSON, 1988).

Alterações bruscas nos níveis de colesterol podem ocorrer em vários processos patológicos. A hipercolesterolemia, por exemplo, pode ser decorrente de moléstias do trato biliar e também de xantomatoses, xantelasma, xantoma diabético, xantoma tuberoso etc. (STRYER, 1996). Já a hipocolesterolemia ocorre em hipertireoidismo, anemia perniciosa, hepatite tóxica, pneumonia, febre tifóide, tuberculose etc. Assim, conclui-se que as substâncias-teste, aqui avaliadas, não apresentaram toxicidade (nas dosagens empregadas) a ponto de ocasionarem patologias características de hipo e hipercolesterolemia.

As reduções de colesterol total ocasionadas pela própolis no grupo G11, embora não sejam significativas, do ponto de vista estatístico, indicam que essa substância pode ser utilizada no tratamento da hipercolesterolemia.

#### **4.3.4. Efeito das substâncias-teste no teor de colesterol-HDL**

Ao analisar o Quadro 10, verificou-se que, durante todo o ensaio toxicológico, o grupo que recebeu talco farmacêutico não apresentou diferença significativa do grupo que só recebeu ração. Assim, concluiu-se que esse veículo não ocasionou alterações consideráveis no nível normal de colesterol-HDL do grupo G10.

Quadro 10– HDL médio, em mgdL<sup>-1</sup>, e percentual de variação em relação aos grupos-controle, em %, de coelhos submetidos a diferentes tratamentos e avaliados durante 30 dias

Tempo (dias)	Grupo Tratado	HDL (mg/dL)	Variação em Relação a:	
			G9	G10
0	G9 = ração (R)	19,22 A	-	-
	G10 = R + talco farmacêutico	13,92 A	-	-
	G11 = R + própolis	19,90 a	-	-
	G12 = R + antocianina	14,25 a	-	-
	G13 = R + antocianina + naringenina	16,02 a	-	-
15	G9	18,37 A	-	-
	G10	15,05 A	-	-
	G11	18,22 a	-0,82	+21,06
	G12	14,08 a	-23,35	-6,45
	G13	15,87 a	-13,61	+5,45
30	G9	19,28 A	-	-
	G10	14,73 A	-	-
	G11	19,20 a	-0,41	+30,35
	G12	14,62 a	-24,17	-0,75
	G13	16,17 a	-16,13	+9,78

Em cada tempo, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula não diferem entre si, pelo teste de Tukey (P>0,05).

Em cada tempo, A difere de B pelo teste F (P<0,05).

\* Estatisticamente diferente do controle pelo teste de Dunnett (P<0,05), em cada tempo.

Aos 15 dias, observou-se que o grupo tratado com a própolis apresentou redução de 0,82% em relação ao grupo tratado somente com ração. Aos 30 dias, essa diminuição foi de 0,41%. Tais reduções foram consideradas estatisticamente irrelevantes, o que demonstra que a própolis não alterou significativamente o teor de colesterol-HDL dos animais do grupo G11.

O grupo tratado com antocianina apresentou quedas de 23,35 e 24,17% aos 15 e 30 dias, respectivamente, em seu nível de HDL, em relação ao grupo G9, mas essas diminuições não foram consideradas significativas, do ponto de vista estatístico. Isso significa que a antocianina não causou alterações relevantes no nível médio de colesterol-HDL do grupo G12.

O grupo tratado com a mistura de flavonóides apresentou diminuição de 13,61 e 16,13% aos 15 e 30 dias, respectivamente, em seu nível médio de colesterol-HDL em relação ao grupo tratado com ração. Porém, essas diminuições não foram consideradas relevantes, do ponto de vista estatístico. Isso indica que a associação entre naringenina e antocianina não alterou significativamente o nível de colesterol-HDL do grupo G13.

Embora o teste de Tukey ( $P < 0,05$ ) tenha demonstrado que os efeitos produzidos pelas substâncias-teste no nível de colesterol-HDL tenham sido semelhantes em todos os grupos, percebeu-se que o tratamento com a própolis apresentou melhores resultados, pois diminuiu somente 0,82 e 0,41%, aos 15 e 30 dias, respectivamente, o nível de HDL. Isso é importante, pois, de acordo com NAGEM et al. (1994), o colesterol-HDL é responsável pelo transporte do colesterol dos tecidos periféricos para o fígado, onde é metabolizado. Redução no nível normal de HDL poderia afetar esse transporte.

#### **4.3.5. Efeitos das substâncias-teste no teor de colesterol-LDL**

Ao analisar o Quadro 11, percebeu-se que o grupo tratado apenas com ração não diferiu, pelo teste F ( $P < 0,05$ ), do que recebeu o talco farmacêutico, durante todo o ensaio toxicológico. Isso demonstra que o talco não provocou alterações no nível normal de colesterol-LDL do grupo G10.

Quadro 11– LDL médio, em  $\text{mgdL}^{-1}$ , e percentual de variação em relação aos grupos-controle, em %, de coelhos submetidos a diferentes tratamentos e avaliados durante 30 dias

Tempo (dias)	Grupo Tratado	LDL (mg/dL)	Variação em Relação a:	
			G9	G10
0	G9 = ração (R)	38,47 A	-	-
	G10 = R + talco farmacêutico	63,27 A	-	-
	G11 = R + própolis	34,48 b	-	-
	G12 = R + antocianina	72,12 a	-	-
	G13 = R + antocianina + naringenina	52,42 ab	-	-
15	G9	38,57 A	-	-
	G10	63,22 A	-	-
	G11	32,20 b	-16,52	-49,07
	G12	73,02 a	+89,32	+15,50
	G13	52,28 ab	+35,55	-17,30
30	G9	38,63 A	-	-
	G10	62,40 A	-	-
	G11	32,18 b	-16,70	-48,43
	G12	72,47 a	+87,60	+16,14
	G13	54,03 ab	+39,87	-13,41

Em cada tempo, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ ).

Em cada tempo, A difere de B pelo teste F ( $P < 0,05$ ).

\* Estatisticamente diferente do controle pelo teste de Dunnett ( $P < 0,05$ ), em cada tempo.

A análise do Quadro 11 também permitiu observar que o grupo tratado com a própolis obteve reduções no seu nível de LDL de 49,07 e 48,43% aos 15 e 30 dias, respectivamente, em relação ao grupo tratado com talco farmacêutico. Esse grupo obteve, também, diminuições de 16,52 e 16,70% aos 15 e 30 dias, respectivamente, em relação ao grupo tratado com ração.

Embora o grupo da própolis tenha apresentado diminuições nos níveis de LDL, estas não foram consideradas estatisticamente relevantes.

Com relação ao grupo tratado com antocianina, os resultados indicaram que essa substância ocasionou reduções de 17,30 e 13,41% aos 15 e 30 dias, respectivamente, nos níveis de LDL em relação ao grupo tratado com talco, mas essas diminuições não foram consideradas estatisticamente relevantes. O grupo que recebeu ração apresentou aumento de LDL, sendo tal aumento não relevante estatisticamente.

Já o grupo tratado com a mistura de flavonóides apresentou aumentos no nível de LDL aos 15 e 30 dias em relação a G9 e G10, porém esses aumentos não foram considerados relevantes pelo teste F ( $P < 0,05$ ).

Os resultados aqui obtidos indicam que todas as substâncias-teste não alteraram significativamente os níveis normais de LDL dos animais. Isso é importante, pois o LDL, juntamente com o HDL, participa da síntese de hormônios esteroidais (LIMA, 2000), e alteração significativa em seu nível normal poderia afetar essa síntese.

#### **4.3.6. Efeitos das substâncias-teste no teor de triacilgliceróis**

A avaliação dos resultados apresentados no Quadro 12 evidenciou que, durante todo o ensaio toxicológico, os grupos G9 (ração) e G10 (ração + talco) não diferiram estatisticamente entre si, pelo teste F a 5% de probabilidade. Esses resultados indicam que o talco não alterou o nível normal de triacilgliceróis do grupo G10.

Ao analisar o comportamento do grupo G11, verificou-se que ele apresentou redução, no nível de triacilgliceróis, de 17,07% aos 15 dias e de 15,66% aos 30 dias em relação ao grupo tratado com ração (G9). Este grupo apresentou, também, reduções de 12,79 e 12,93% aos 15 e 30 dias, respectivamente, em relação ao grupo que recebeu talco. Tais reduções não foram consideradas relevantes pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

Quadro 12– Triacilglicerol médio, em mgdL<sup>-1</sup>, e percentual de variação em relação aos grupos-controle, em %, de coelhos submetidos a diferentes tratamentos e avaliados durante 30 dias

Tempo (dias)	Grupo Tratado	Triacilglicerol (mg/dL)	Variação em Relação a:	
			G9	G10
0	G9 = ração (R)	84,33 A	-	-
	G10 = R + talco farmacêutico	80,60 A	-	-
	G11 = R + própolis	73,78 a	-	-
	G12 = R + antocianina	76,22 a	-	-
	G13 = R + antocianina + naringenina	64,72 a	-	-
15	G9	81,90 A	-	-
	G10	77,88 A	-	-
	G11	67,92 a	-17,07	-12,79
	G12	64,02 a	-21,83	-17,80
	G13	60,00 a	-26,74	-22,96
30	G9	81,63 A	-	-
	G10	79,07 A	-	-
	G11	68,85 a	-15,66	-12,93
	G12	50,50 b	-38,14	-36,13
	G13	59,02 ab	-27,70	-25,36

Em cada tempo, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ ).

Em cada tempo, A difere de B pelo teste F ( $P < 0,05$ ).

\* Estatisticamente diferente do controle pelo teste de Dunnett ( $P < 0,05$ ), em cada tempo.

Aos 15 dias, o grupo tratado com a antocianina (G12) teve redução de 21,83% em seu nível de triacilgliceróis em relação ao grupo tratado com ração. Essa redução foi considerada estatisticamente significativa.

Aos 30 dias, além de apresentar redução significativa de 38,14% em relação ao grupo G9, o grupo G12 apresentou, também, redução considerável, do ponto de vista estatístico, de 36,13% em relação ao grupo tratado com o talco. Isso indica que a antocianina reduziu significativamente os triacilgliceróis no sangue dos animais do grupo G12.

O grupo tratado com a mistura de flavonóides (antocianina + naringenina) também apresentou reduções significativas aos 15 e 30 dias. A maior redução foi, aos 30 dias, de 27,70% em relação ao grupo que recebeu somente ração.

Os triacilgliceróis são o grupo mais significativo de lipídios, do ponto de vista do metabolismo energético dos animais. Eles podem ser fornecidos pela dieta ou ser sintetizados, a partir de fontes não-lipídicas. Essa síntese ocorre amplamente no fígado, no tecido adiposo, na glândula mamária em lactação, nos rins, no cérebro e nos pulmões (SWENSON, 1988).

A hipertrigliceridemia é observada em males como: diabete, síndrome nefrótica, pancreatite, arterosclerose e em doenças coronarianas (OSOL, s.d.; LIMA, 2000). Mesmo que os animais deste ensaio não estivessem hipertrigliceridêmicos, a antocianina e a associação de antocianina e naringenina demonstraram ser promissoras no tratamento de elevados níveis de triacilgliceróis. Esses resultados reforçam aqueles obtidos nos dois ensaios anteriores, que apresentaram a tendência destes flavonóides em reduzir níveis elevados de triacilgliceróis em animais diabéticos. Nesse ensaio toxicológico, a maior redução ocorreu nos grupos que se submeteram à antocianina.

Embora a própolis não tenha proporcionado resultados significativos na redução dos triacilgliceróis, pode-se dizer que essa substância também apresenta tendência em causar diminuição deste constituinte.

#### **4.3.7. Efeitos das substâncias-teste sobre o teor de proteína total**

Pela avaliação do Quadro 13, verificou-se que o grupo tratado com ração (G9) não diferiu estatisticamente, durante todo o ensaio, do grupo que recebeu, além de ração, talco farmacêutico (G10). Isso comprova que o talco não influenciou o nível normal de proteína total do grupo G10.

Quadro 13– Teor de proteína médio, em mgdL<sup>-1</sup>, e percentual de variação em relação aos grupos-controle, em %, de coelhos submetidos a diferentes tratamentos e avaliados durante 30 dias

Tempo (dias)	Grupo Tratado	Proteína (mg/dL)	Variação em Relação a:	
			G9	G10
0	G9 = ração (R)	51,90 A	-	-
	G10 = R + talco farmacêutico	51,52 A	-	-
	G11 = R + própolis	51,78 a	-	-
	G12 = R + antocianina	48,33 a	-	-
	G13 = R + antocianina + naringenina	57,23 a	-	-
15	G9	51,70 A	-	-
	G10	52,40 A	-	-
	G11	51,57 a	-0,25	-1,58
	G12	47,65 a	-7,83	-9,06
	G13	57,02 a	+10,29	+8,82
30	G9	53,13 A	-	-
	G10	51,27 A	-	-
	G11	50,70 a	-4,57	-1,11
	G12	48,63 a	-8,47	-5,15
	G13	59,65 a	+12,27	+16,34

Em cada tempo, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula não diferem entre si, pelo teste de Tukey (P>0,05).

Em cada tempo, A difere de B pelo teste F (P<0,05).

\* Estatisticamente diferente do controle pelo teste de Dunnett (P<0,05), em cada tempo.

Aos 15 dias, o grupo tratado com a própolis (G11) apresentou redução de 0,25% em relação ao grupo tratado com ração (G9). Este grupo apresentou, também, redução de 1,58% em relação ao grupo tratado com talco farmacêutico (G10). Já aos 30 dias, o grupo G11 teve diminuições de 4,57% em relação ao grupo G9 e 1,11% em relação ao grupo G10. Essas diminuições não foram consideradas relevantes do ponto de vista estatístico, levando a crer que a própolis não alterou significativamente o nível normal de proteína total do grupo G11.

Com relação ao comportamento exibido pelo grupo que recebeu antocianina 20 mg em forma de cápsulas, este apresentou reduções de 7,83 e 8,47% aos 15 e 30 dias, respectivamente, em relação ao grupo tratado com ração. Este grupo apresentou, também, reduções pequenas em relação ao grupo tratado com talco. Essas diminuições não foram consideradas significativas, do ponto de vista estatístico. Logo, pode-se concluir que a antocianina não influenciou, significativamente, o nível normal de proteína total do grupo G12.

A análise do comportamento do grupo que recebeu a mistura contendo antocianina e naringenina revelou que este grupo apresentou, aos 15 e 30 dias, aumentos de 10,29 e 12,27%, respectivamente, em relação ao grupo tratado com ração. Foram observados também aumentos, em relação ao grupo tratado com talco, de 8,82 e 16,34% aos 15 e 30 dias, respectivamente. Embora tenham ocorrido tais aumentos, eles não foram considerados significativos do ponto de vista estatístico. Isso leva a crer que a mistura de flavonóides não alterou significativamente o nível normal de proteína total.

Mais de 7% do plasma sanguíneo consiste em proteínas como albumina, globulinas ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\gamma$ ) e fibrinogênio. Outras proteínas em microquantidades são anticorpos, enzimas e certos tipos de hormônios. As  $\gamma$ -globulinas são produzidas pelos linfócitos e pelas células plasmáticas. Essas proteínas são denominadas imunoglobulinas. As imunoglobulinas são classificadas em IgM, IgG, IgA, IgD e IgE, sendo IgG a mais abundante nos animais normais. A IgE é produzida pelos animais que estão enfrentando processos alérgicos diversos. Dessa forma, num processo alérgico ocorre aumento de proteína total no plasma, incrementado pela IgE (SWENSON, 1988).

A albumina plasmática, o fibrinogênio, parte das globulinas e a protrombina são formados no fígado. As globulinas, incluindo  $\gamma$ -globulinas, são formadas nos linfonodos e em outras células do sistema reticuloendotelial do baço e da medula óssea. A síntese de proteínas plasmáticas é reduzida significativamente nas lesões hepáticas graves ou deficiências prolongadas de proteínas na dieta. Isso pode reduzir o fibrinogênio plasmático, resultando em aumento do tempo de protrombina e retardando o tempo de coagulação do sangue nos capilares. A pressão osmótica, produzida pelas proteínas plasmáticas, opõe-se à pressão hidrostática e, dessa forma, evita o excesso de passagem de água para os tecidos, o que pode causar edema (SWENSON, 1988).

Os resultados obtidos neste modelo experimental indicaram que tanto a própolis quanto os flavonóides não alteraram significativamente os níveis normais de proteína total no sangue dos animais. Isso leva a crer que não ocorreram danos ao organismo desses animais, por exemplo lesões hepáticas, resultantes da administração dessas substâncias. Além disso, sabendo que os níveis normais de proteínas plasmáticas em coelhos são da ordem de 50 a 53 mg/dL, verificou-se que os mesmos estão de acordo com os apresentados no Quadro 13.

Resultados indicando a não-toxicidade de flavonóides em relação aos níveis normais de proteínas plasmáticas também foram obtidos por LIMA (2000), que, ao avaliar os efeitos toxicológicos de alguns flavonóides (dentre eles a quercetina) no nível de proteína total de coelhos saudáveis, verificou que tais substâncias não provocaram alterações consideráveis no metabolismo protéico desses animais.

#### **4.3.8. Efeitos das substâncias-teste no teor de albumina**

Pela análise do Quadro 14, observou-se que os grupos G9 e G10 não diferiram estatisticamente, em teor médio de albumina, durante todo o ensaio de toxicologia. Concluiu-se, então, que o talco farmacêutico não causou alterações significativas no nível dessa proteína do grupo G10.

Quadro 14– Teor de albumina médio, em g dL<sup>-1</sup>, e percentual de variação em relação aos grupos-controle, em %, de coelhos submetidos a diferentes tratamentos e avaliados durante 30 dias

Tempo (dias)	Grupo Tratado	Albumina (g/dL)	Variação em Relação a:	
			G9	G10
0	G9 = ração (R)	4,43 A		
	G10 = R + talco farmacêutico	4,42 A		
	G11 = R + própolis	4,34 a		
	G12 = R + antocianina	4,54 a		
	G13 = R + antocianina + naringenina	4,51 a		
15	G9	4,45 A		
	G10	4,44 A		
	G11	4,32 a	-2,93	-2,70
	G12	4,53 a	+1,80	+2,03
	G13	4,51 a	+1,35	+1,58
30	G9	4,46 A	-	-
	G10	4,44 A	-	-
	G11	4,33 a	-2,91	-2,48
	G12	4,54 a	+1,79	+2,25
	G13	4,49 a	+0,67	+1,13

Em cada tempo, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula não diferem entre si, pelo teste de Tukey (P>0,05).

Em cada tempo, A difere de B pelo teste F (P<0,05).

\* Estatisticamente diferente do controle pelo teste de Dunnett (P<0,05), em cada tempo.

Aos 15 e 30 dias, observaram-se quedas de 2,93 e 2,91%, respectivamente, no nível médio de albumina do grupo tratado com a própolis em relação ao grupo tratado com ração. Diminuições semelhantes foram apresentadas, também por esse grupo, em relação ao grupo tratado com talco. Tais reduções foram consideradas irrelevantes de acordo com o teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

Foram observados, também, pequenos aumentos nos teores de albumina dos grupos tratados com antocianina e com a associação desta com a naringenina, em relação aos grupos G9 e G10. Tais aumentos foram considerados irrelevantes do ponto de vista estatístico.

A albumina é a mais importante proteína plasmática (em humanos, aproximadamente 4,5 g/dL) e corresponde a cerca de 60% das proteínas plasmáticas totais; por volta de 40% está presente no plasma e 60% no espaço extracelular. O fígado produz 12 g de albumina/dia, representando 25% do total de proteínas sintetizadas pelo fígado e metade das proteínas secretadas. Entre as funções importantes da albumina está a capacidade desse polipeptídeo de se ligar a várias substâncias, que incluem hormônios esteróides, bilirubina e alguma porção do triptofano do plasma. Além disso, a albumina se liga a aproximadamente 10% do cobre plasmático. Uma variedade de drogas, incluindo sulfonamidas, penicilina G e aspirina, liga-se à albumina, o que tem implicações farmacológicas. Acredita-se, também, que a albumina seja responsável por cerca de 75 a 80% da pressão osmótica do plasma (MURRAY et al., 1994).

A síntese de albumina é afetada em uma série de moléstias, particularmente aquelas do fígado. O plasma de pacientes com doença do fígado freqüentemente apresenta decréscimo da relação A:G (albumina: globulina) (MURRAY et al., 1994).

Os resultados obtidos neste ensaio toxicológico indicam que as substâncias-teste não ocasionaram alterações significativas nos níveis normais de albumina dos animais dos grupos G11, G12 e G13. Essa conclusão é reforçada quando se observa a semelhança dos níveis dessa proteína, no Quadro 15, com os encontrados na literatura, com relação a coelhos, da ordem de 4,0 a 4,5 g/dL.

#### **4.3.9. Efeitos das substâncias-teste na atividade de gama-glutamil transferase (Gama-GT)**

Avaliando o Quadro 15, observou-se que durante todo o ensaio toxicológico os grupos G9 (ração) e G10 (talco farmacêutico) não divergiram significativamente entre si. Isso indica que o talco farmacêutico não alterou a atividade normal de gama GT.

Aos 15 dias, o grupo tratado com a própolis (G11) apresentou queda na atividade de gama GT de 11,25%. Porém, nenhuma alteração foi observada em relação ao grupo tratado com talco farmacêutico (G10). Já aos 30 dias houve aumento na atividade de gama GT, do grupo G11, de 5,91% em relação ao grupo G10 e diminuição de 6,63% em relação ao grupo que recebeu somente ração. Embora essas alterações tenham ocorrido, elas não foram consideradas relevantes, do ponto de vista estatístico.

Com relação ao grupo tratado com antocianina (G12), observou-se que ocorreu redução, na atividade de gama GT, desse grupo de 3,75% em relação ao grupo que recebeu apenas ração (G9); isso aos 15 dias de experimento. Já em relação ao grupo tratado com talco (G10), o que se observou foi aumento de 8,45% na atividade dessa enzima.

Novas alterações voltaram a ocorrer na atividade de gama GT, do grupo G12, aos 30 dias de experimento. Nesse período, ocorreu aumento de 17,91% em relação ao grupo G10, bem como aumento de 3,95% em relação a G9.

Embora tenham ocorrido alterações na atividade de gama GT, no grupo que recebeu antocianina elas não foram significativas pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

Na análise do comportamento do grupo que recebeu a mistura contendo antocianina e naringenina (G13), observou-se que o mesmo apresentou reduções, na atividade de gama-GT, de 19,85 e 5,29% aos 15 e 30 dias, respectivamente, em relação ao grupo que recebeu apenas ração (G9). Alterações no sentido de diminuição e aumento também foram observadas nesse grupo em relação ao que recebeu apenas talco (G10). Porém, todas essas alterações foram consideradas irrelevantes, do ponto de vista estatístico.

Quadro 15– Gama-GT médio, em U.I., e percentual de variação em relação aos grupos-controle, em %, de coelhos submetidos a diferentes tratamentos e avaliados durante 30 dias

Tempo (dias)	Grupo Tratado	Gama GT (U.I.)	Variação em Relação a:	
			G9	G10
0	G9 = ração (R)	12,83 A		
	G10 = R + talco farmacêutico	11,33 A		
	G11 = R + própolis	12,33 a		
	G12 = R + antocianina	13,17 a		
	G13 = R + antocianina + naringenina	11,67 a		
15	G9	13,33 A	-	-
	G10	11,83 A	-	-
	G11	11,83 a	-11,25	0
	G12	12,83 a	-3,75	+8,45
	G13	10,67 a	-19,85	-9,81
30	G9	12,67 A	-	-
	G10	11,17 A	-	-
	G11	11,83 a	-6,63	+5,91
	G12	13,17 a	+3,95	+17,91
	G13	12,00 a	-5,29	+7,43

Em cada tempo, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ ).

Em cada tempo, A difere de B pelo teste F ( $P < 0,05$ ).

\* Estatisticamente diferente do controle pelo teste de Dunnett ( $P < 0,05$ ), em cada tempo.

A gama-GT é uma indicadora sensível das doenças hepáticas. Os níveis são freqüentemente elevados nas disfunções do fígado, ocasionadas por alcoolismo. Essa enzima está presente no fígado, nos rins e no pâncreas e transfere ácido glutâmico C-terminal de um peptídeo para outros peptídios ou L-aminoácidos (MURRAY et al., 1994).

Os resultados aqui obtidos indicam que as substâncias-teste não interferiram significativamente na atividade de gama-GT. Isso significa que elas não ocasionaram problemas hepáticos nos animais.

#### **4.3.10. Efeitos das substâncias-teste na atividade de transaminase glutâmico oxalacético (TGO)**

Quando analisou o Quadro 16, verificou-se que nenhuma diferença significativa, pelo teste F ( $P < 0,05$ ), ocorreu aos 15 e 30 dias entre os grupos G9 e G10. Isso indica que o talco farmacêutico não alterou, de forma significativa, a atividade de TGO no grupo G10.

Em relação ao grupo tratado com a própolis (G11), verificaram-se alterações aos 15 e 30 dias, com a ressalva de que a maior alteração ocorreu aos 30 dias. Nesse período, o grupo G11 apresentou aumento de 12,07% em relação ao grupo que recebeu talco. Porém, tais alterações não foram consideradas relevantes, do ponto de vista estatístico.

A análise do comportamento do grupo tratado com antocianina (G12) revelou ocorrências de alterações da atividade de TGO aos 15 e 30 dias, tendo a alteração mais acentuada ocorrido aos 15 dias. Nesse período houve redução, na atividade de TGO, de 33,19% em relação ao grupo que recebeu talco farmacêutico (G10). No entanto, essa e as outras alterações foram desconsideráveis estatisticamente.

Observando o Quadro 16, constatou-se que o grupo G13 tratado com a mistura de flavonóides (antocianina + naringenina) também apresentou alterações em sua atividade de TGO, tanto em relação a G9 quanto em relação a G10. A maior alteração foi aos 15 dias, quando o grupo G13 apresentou redução de 28,60% em relação ao grupo G10. No entanto, essas alterações foram consideradas irrelevantes, do ponto de vista estatístico.

Quadro 16– TGO médio, em U.I., e percentual de variação em relação aos grupos-controle, em %, de coelhos submetidos a diferentes tratamentos e avaliados durante 30 dias

Tempo (dias)	Grupo Tratado	TGO (U.I.)	Variação em Relação a:	
			G9	G10
0	G9 = ração (R)	65,50 A	-	-
	G10 = R + talco farmacêutico	81,67 A	-	-
	G11 = R + própolis	72,67 a	-	-
	G12 = R + antocianina	56,00 a	-	-
	G13 = R + antocianina + naringenina	64,50 a	-	-
15	G9	65,83 A	-	-
	G10	83,33 A	-	-
	G11	73,33 a	+11,39	-12,00
	G12	55,67 a	-15,43	-33,19
	G13	59,50 a	-9,62	-28,60
30	G9	67,33 A	-	-
	G10	82,83 A	-	-
	G11	72,83 a	+8,17	-12,07
	G12	56,33 a	-16,34	-31,99
	G13	62,33 a	-7,43	-24,75

Em cada tempo, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ ).

Em cada tempo, A difere de B pelo teste F ( $P < 0,05$ ).

\* Estatisticamente diferente do controle pelo teste de Dunnett ( $P < 0,05$ ), em cada tempo.

As transaminases (TGP, TGO etc.) catalisam a transferência de uma amina  $\alpha$  de um aminoácido para um  $\alpha$ -cetoácido. Essas enzimas, geralmente, encaminham os grupos amina  $\alpha$  de vários aminoácidos para o  $\alpha$ -cetoglutarato, para a conversão em  $\text{NH}_4^+$  (STRYER, 1996; LEHNINGER, 2000). Essas enzimas estão presentes em altas concentrações no músculo, fígado e cérebro. A elevação da atividade das transaminases no sangue indica necrose ou moléstia, especialmente nesses tecidos (MURRAY et al., 1994).

Os resultados aqui apresentados evidenciam que as substâncias-teste não ocasionaram alterações significativas na atividade da TGO, levando a crer que também não causaram danos relacionados ao aumento da atividade dessa enzima nos animais utilizados neste modelo experimental.

Em outro estudo de toxicidade aguda, LIMA (2000) constatou que alguns flavonóides (dentre eles a rutina) não alteraram significativamente a atividade de TGO em coelhos machos albinos da raça *Nova Zelândia*.

#### **4.3.11. Efeitos das substâncias-teste na atividade da transaminase glutâmico pirúvico (TGP)**

A análise do Quadro 17 revelou que, durante todo o ensaio toxicológico, o grupo que recebeu apenas ração (G9) permaneceu diferente, estatisticamente, do que recebeu, além de ração, talco farmacêutico. Isso não quer dizer que esse veículo influenciou a atividade de TGP, uma vez que, mesmo antes de se administrar o talco, os grupos já eram, por natureza, estatisticamente diferentes.

Ao estudar o comportamento do grupo G11 (própolis), percebeu-se que, aos 15 dias, ocorreu diminuição bastante considerável (67,11%), em relação ao grupo-controle G9 (ração), da atividade de TGP. No entanto, a diminuição de 19,69%, em relação ao grupo que recebeu talco (G10), foi considerada irrelevante, do ponto de vista estatístico.

Aos 30 dias, o grupo G11 voltou a apresentar diminuição significativa, pelo teste de Dunnett ( $P < 0,05$ ), de 66,99% em relação ao grupo tratado com ração. Porém, mais uma vez, a diminuição da atividade de TGP (16,27%), por parte desse grupo em relação ao que recebeu talco (G10), foi considerada irrelevante.

Quadro 17– TGP médio, em U.I., e percentual de variação em relação aos grupos-controle, em %, de coelhos submetidos a diferentes tratamentos e avaliados durante 30 dias

Tempo (dias)	Grupo Tratado	TGP (U.I.)	Variação em Relação a:	
			G9	G10
0	G9 = ração (R)	106,33 A	-	-
	G10 = R + talco farmacêutico	40,00 B	-	-
	G11 = R + própolis	34,00 b	-68,02	-15,00
			*	
	G12 = R + antocianina	41,00 b	-61,44	+2,50
			*	
	G13 = R + antocianina + naringenina	96,00 a	-9,72	+140,00
15	G9	101,33 A	-	-
	G10	41,50 B	-	-
	G11	33,33 b	-67,11 *	-19,69
	G12	41,50 b	-59,04 *	0
	G13	92,17 a	-9,04	+122,10
				*
30	G9	104,00 A	-	-
	G10	41,00 B	-	-
	G11	34,33 b	-66,99 *	-16,27
	G12	40,33 b	-61,22 *	-1,63
	G13	96,33 a	-7,38	+134,95
				*

Em cada tempo, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ ).

Em cada tempo, A difere de B pelo teste F ( $P < 0,05$ ).

\* Estatisticamente diferente do controle pelo teste de Dunnett ( $P < 0,05$ ), em cada tempo.

Ao estudar o comportamento do grupo que recebeu antocianina (G12), observou-se que, aos 15 dias, ele apresentou diminuição de 59,04% na atividade de TGP, em relação ao grupo-controle, que recebeu somente ração (G9). Porém, nenhuma alteração ocorreu em relação ao grupo que recebeu talco farmacêutico (G10).

Aos 30 dias, nova alteração, bastante significativa (-61,22%), ocorreu na atividade de TGP, do grupo G12, em relação ao grupo G9. No entanto, novamente, em relação ao grupo que recebeu talco, essa alteração foi considerada irrelevante (-1,63%).

O grupo que recebeu a mistura de antocianina com naringenina (G13) apresentou aos 15 dias, pelo teste de Dunnett ( $P < 0,05$ ), aumento considerável (122,10%) na atividade de TGP, em relação ao grupo que recebeu talco farmacêutico (G10). No entanto, teve diminuição insignificante de 9,04% em relação ao grupo que recebeu ração (G9).

Aos 30 dias, G13 exibiu o mesmo comportamento de 15 dias anteriores, ou seja, aumento considerável (134,95%) em relação ao grupo que recebeu talco farmacêutico (G10), e uma diminuição desconsiderável (7,38%) em relação ao grupo que recebeu ração (G9).

Embora pareça que as substâncias-teste influenciaram profundamente a atividade de TGP, deve-se considerar o fato de que os grupos G11 e G12 já apresentavam aumentos estatisticamente significativos, em relação ao grupo G9, antes mesmo de se iniciarem os tratamentos com a própolis e com a antocianina. Isso quer dizer que já era de natureza desses grupos essa relação de divergência. Além disso, os grupos G11 e G12 não apresentaram alterações significativas em relação ao grupo que recebeu talco farmacêutico (G10).

Em relação ao grupo G13, não se pode afirmar que as alterações significativas, ocorridas na atividade de TGP, possam ter sido ocasionadas pelo tratamento com a mistura de flavonóides (antocianina + naringenina). Isso porque esse grupo já era, por natureza, estatisticamente diferente do grupo G10 (talco). No primeiro dia de experimento, antes de se administrar a mistura de flavonóides já havia ocorrido aumento de 140% na atividade de TGP do grupo G13 em relação ao G10. Além disso, esse grupo não apresentou diferenças significativas, durante todo o ensaio, em relação ao grupo-controle, que recebeu apenas ração (G9).

Com essas informações, pode-se deduzir que as alterações ocorridas na atividade de TGP dos grupos G11, G12 e G13 não foram decorrentes da administração da própolis e dos flavonóides.

LIMA (2000), ao estudar os efeitos de flavonóides (dentre eles a quercetina e a apigenina) em coelhos normais, verificou que os mesmos não alteraram significativamente a atividade de TGP no plasma sanguíneo desses animais.

#### **4.3.12. Efeito das substâncias-teste no teor de fósforo**

Observou-se, no Quadro 18, que os grupos G9 e G10 não diferiram entre si de modo significativo durante todo o ensaio toxicológico. Isso quer dizer que o talco farmacêutico não influenciou o teor médio de fósforo do grupo G10.

Com relação ao grupo que recebeu própolis, pode-se dizer que ele apresentou alterações praticamente insignificantes durante todo o ensaio. Essas alterações foram de diminuições de 2,93 e 2,91% aos 15 e 30 dias, respectivamente, em relação ao grupo G9 e também em torno desses percentuais em relação ao grupo G10. O mesmo se observou em relação aos comportamentos dos grupos G12 (antocianina) e G13 (antocianina + naringenina), que apresentaram alterações insignificantes em seus teores médios de fósforo quando comparados com os grupos G9 e G10, pelo teste de Dunnett ( $P < 0,05$ ).

O fósforo é, possivelmente, o elemento que desempenha o papel mais variado na química dos organismos vivos (NUNES, 1995). Esse elemento tem funções mais conhecidas do que as de qualquer outro elemento mineral, nos seres vivos. Ele combina com o cálcio e carbonato para formar compostos que proporcionam rigidez aos ossos e dentes. Além disso, está presente em todas as células do corpo, tendo função vital em muitos processos metabólicos, inclusive naqueles relacionados aos tampões nos líquidos corporais (SWENSON, 1988). Sua concentração no plasma é influenciada pela função da glândula paratiróide, ação da vitamina D, absorção intestinal, função renal, metabolismo dos ossos e nutrição (MURRAY et al., 1994).

Quadro 18– Teor de fósforo médio, em mg dL<sup>-1</sup>, e percentual de variação em relação aos grupos-controle, em %, de coelhos submetidos a diferentes tratamentos e avaliados durante 30 dias

Tempo (dias)	Grupo Tratado	Fósforo (mg/dL)	Variação em Relação a:	
			G9	G10
0	G9= ração (R)	8,01 A	-	-
	G10= R + talco farmacêutico	7,04 A	-	-
	G11= R + própolis	7,66 a	-	-
	G12= R + antocianina	8,16 a	-	-
	G13= R + antocianina + naringenina	8,48 a	-	-
15	G9	8,03 A	-	-
	G10	7,05 A	-	-
	G11	7,55 a	-5,98	+7,09
	G12	8,07 a	+0,50	+14,47
	G13	8,40 a	+4,61	+19,15
30	G9	7,98 A	-	-
	G10	7,16 A	-	-
	G11	7,54 a	-5,51	+5,31
	G12	8,18 a	+2,51	+14,25
	G13	8,49 a	+6,39	+18,58

Em cada tempo, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula não diferem entre si, pelo teste de Tukey (P>0,05).

Em cada tempo, A difere de B pelo teste F (P<0,05).

\* Estatisticamente diferente do controle pelo teste de Dunnett (P<0,05), em cada tempo.

Um excesso relativo de fósforo em relação ao cálcio pode resultar em algumas situações bastante danosas. A ingestão desse elemento duas ou três vezes mais que a necessidade por longos períodos causará problemas severos, em razão das modificações no metabolismo do cálcio (NUNES, 1995). Os níveis elevados de fósforo no soro são observados em insuficiência renal, hipoparatiroidismo etc. Já seus níveis reduzidos são observados em hiperparatiroidismo, raquitismo, síndrome de má absorção, ingestão de antiácidos que ligam o fosfato ao intestino, alcoolismo crônico (especialmente com doença hepática) etc. (MURRAY et al., 1994).

Assim, ao constatar que as substâncias-teste não causaram alterações significativas no metabolismo do fósforo, pode-se concluir, então, que as mesmas não ocasionaram ao organismo desses animais danos que estivessem relacionados à concentração desse elemento no plasma.

#### **4.3.13. Efeito das substâncias-teste no teor de cloretos**

Na análise do Quadro 19, verificou-se que durante todo o ensaio toxicológico os grupos G9 e G10 não se distanciaram significativamente. Isso indica que o talco farmacêutico não influenciou o teor de cloretos no plasma sanguíneo dos animais.

Com ralação ao grupo que recebeu própolis, percebeu-se que ele apresentou alterações em seu teor de cloretos durante todo o ensaio. Essas alterações, tanto em relação ao grupo G9 quanto ao G10, já ocorriam desde o início do ensaio, ou seja, já existiam mesmo antes de se administrarem as substâncias-teste. Notou-se, também, que essas alterações se apresentaram uniformes durante todo o ensaio. Assim, constatou-se que as diminuições significativas ocorridas nesse grupo não devem ser atribuídas ao uso das substâncias-teste.

As alterações ocorridas no grupo que recebeu antocianina associada com naringenina também não devem ser atribuídas à administração das substâncias-teste, uma vez que, mesmo antes de se submeter a essas substâncias, o grupo G13 já apresentava tais alterações, que se caracterizavam por diminuições significativas, mais ou menos uniformes, no teor médio de cloreto.

Quadro 19– Teor de cloreto médio, em mmol L<sup>-1</sup>, e percentual de variação em relação aos grupos-controle, em %, de coelhos submetidos a diferentes tratamentos e avaliados durante 30 dias

Tempo (dias)	Grupo Tratado	Cloro (mmol/L)	Variação em Relação a:	
			G9	G10
0	G9 = ração (R)	83,58 A	-	-
	G10 = R + talco farmacêutico	84,37 A	-	-
	G11 = R + própolis	76,12 b	-8,93	-9,78 *
			*	
	G12 = R + antocianina	85,38 a	+2,15	+1,20
	G13 = R + antocianina + naringenina	76,80 b	-8,11	-8,97 *
			*	
15	G9	83,72 A	-	-
	G10	82,87 A	-	-
	G11	77,28 b	-7,69 *	-6,75 *
	G12	84,77 a	+1,25	+2,29
	G13	76,75 b	-8,33 *	-7,39 *
30	G9	82,80 A	-	-
	G10	82,60 A	-	-
	G11	76,58 b	-7,51	-7,29 *
			*	
	G12	84,00 a	+1,45	+1,69
	G13	73,10 b	-11,71	-11,50
			*	*

Em cada tempo, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula não diferem entre si, pelo teste de Tukey (P>0,05).

Em cada tempo, A difere de B pelo teste F (P<0,05).

\* Estatisticamente diferente do controle pelo teste de Dunnett (P<0,05), em cada tempo.

Com relação ao grupo que recebeu antocianinas, não se observaram alterações significativas durante todo o ensaio toxicológico.

O cloro é indispensável a todos os animais (NUNES, 1995). Ele é o principal íon inorgânico do fluido extracelular (MURRAY et al., 1994). Juntamente com o sódio, age no organismo controlando a pressão osmótica, o balanço hídrico, a ação cardíaca e a condução do impulso e transmissões neurais (NUNES, 1995). Seus níveis elevados podem ser decorrentes de insuficiência renal (quando a ingestão de cloretos excede a excreção), acidose dos túbulos renais, ureterossigmóide (reabsorção de urina no intestino) etc. E seus níveis reduzidos podem ser devidos a doenças gastrointestinais (vômitos, diarreia), acidose respiratória crônica, insuficiência adrenal (perda de NaCl) etc. (MURRAY et al., 1994).

Uma vez que os grupos G11 e G13 já apresentavam alterações em seus níveis de cloretos, em relação aos controles, mesmo antes da administração das substâncias, não se pode dizer que os possíveis danos no organismo desses animais que levaram a essa distorção no metabolismo de cloretos possam ter sido causados pela administração da própolis e da mistura contendo antocianina e naringenina. Já quanto ao grupo G12, não ocorreram danos ao organismo desses animais, ocasionados pela antocianina, que levassem a um distúrbio no metabolismo de cloretos.

#### **4.3.14. Efeito das substâncias-teste no teor de cálcio**

Observando o Quadro 20, verificou-se que, durante todo o ensaio, o grupo G9 não se diferenciou significativamente, pelo teste F, do grupo G10. Isso indica que o talco não alterou a concentração de cálcio no sangue dos animais desse grupo.

Quando se fez comparação entre os grupos-tratamento e os grupos-controle, percebeu-se que o grupo que recebeu a própolis (G11) não se distanciou significativamente do grupo-controle G9 durante todo o ensaio. Porém, quando foi comparado este grupo com o G10, verificou-se que ambos se diferenciaram de maneira considerável, pelo teste de Dunnett, durante todo o ensaio. No entanto, ao observar a relação entre esses dois grupos, notou-se que o G11 já era significativamente diferente de G10 mesmo antes de se

Quadro 20– Teor de cálcio médio, em mgdL<sup>-1</sup>, e percentual de variação em relação aos grupos-controle, em %, de coelhos submetidos a diferentes tratamentos e avaliados durante 30 dias

Tempo (dias)	Grupo Tratado	Cálcio (mg/dL)	Variação em Relação a:	
			G9	G10
0	G9 = 120 mg de ração (R)	15,13 A	-	-
	G10 = R + 100 mg de talco farmacêutico	16,43 A	-	-
	G11 = R + 150 mg de própolis	12,48 a	-17,51	-24,04 *
	G12 = R + 200 mg de antocianina	13,48 a	-10,91	-17,95
	G13 = R + 100 mg de antocianina + 0 mg de naringenina	14,45 a	-4,49	-12,05
15	G9	15,73 A	-	-
	G10	17,22 A	-	-
	G11	12,92 a	-17,86	-24,97 *
	G12	13,35 a	-15,13	-22,47 *
	G13	14,17 a	-9,92	-17,71
30	G9	15,63 A	-	-
	G10	16,57 A	-	-
	G11	12,97 a	-17,02	-21,73 *
	G12	13,00 a	-16,83	-21,54 *
	G13	14,33 a	-8,32	-13,52

Em cada tempo, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula não diferem entre si, pelo teste de Tukey (P>0,05).

Em cada tempo, A difere de B pelo teste F (P<0,05).

\* Estatisticamente diferente do controle pelo teste de Dunnett (P<0,05), em cada tempo.



administrar a própolis. O grupo G11 já apresentava diminuição de 24,04% em relação ao grupo G10 e assim persistiu, de maneira praticamente uniforme, até o final do ensaio. Isso indica que a própolis não foi a responsável por essas alterações.

Os outros grupos-tratamento G12 e G13 não apresentaram diferenças significativas dos grupos G9 e G10 durante todo o ensaio. Isso indica que a antocianina e a mistura dela com a naringenina não influenciaram a concentração de cálcio no plasma sanguíneo dos animais.

Mais de 40 a 50% do cálcio plasmático está sob a forma solúvel, ionizada, ao passo que 40 a 45% dele está ligado à proteína, principalmente albumina e outras proteínas plasmáticas. Os restantes 5% formam complexo com elementos inorgânicos não-ionizados, de acordo com o pH do sangue. O cálcio plasmático é fundamental para a coagulação sanguínea. Ele também é necessário para a permeabilidade de membranas, a excitabilidade neuromuscular, a transmissão dos impulsos nervosos e a ativação de determinados sistemas enzimáticos. A redução no cálcio sanguíneo aumenta a irritabilidade do tecido nervoso, e níveis muito baixos do elemento podem ocasionar descargas espontâneas de impulsos nervosos, acarretando tetania e convulsões. A hipocalcemia pode causar fraqueza cardíaca. A hipercalcemia de cálcio diminui a atividade cardíaca e gera insuficiência cardíaca (SWENSON, 1988).

Nesse ensaio, verificou-se que as substâncias-teste não ocasionaram danos ao organismo dos coelhos a ponto de levar a hipo ou a hipercalcemia. O grupo da própolis já tinha esse metabolismo de cálcio, divergente significativamente, em relação ao grupo que recebeu somente ração e em relação ao que recebeu, além de ração, o talco farmacêutico.

Em outro trabalho, LIMA (2000), ao estudar os efeitos de alguns flavonóides (dentre eles a rutina) no metabolismo de cálcio de coelhos saudáveis, verificou que tais substâncias não provocaram alterações significativas nas concentrações normais desse elemento no sangue desses animais.

## 5. RESUMO E CONCLUSÕES

O experimento da presente pesquisa teve como objetivo investigar os efeitos da própolis e de flavonóides em coelhos normais e diabéticos, para o que foram realizados três ensaios biológicos.

No primeiro ensaio foram testados os efeitos da própolis em forma de comprimidos de 150 mg e da mistura de flavonóides em forma de cápsulas contendo 10 mg de antocianinas de uva roxa e 10mg de naringenina de laranja em coelhos com diabetes induzida pela droga aloxano. Esses coelhos eram machos albinos da raça Nova Zelândia, que foram divididos em quatro grupos [**G1** (recebeu 120g de ração diariamente), **G2** (recebeu, além de ração, o aloxano), **G3** (recebeu, além de ração e aloxano, um comprimido de própolis diariamente) e **G4** (recebeu, além de ração e aloxano, uma cápsula de antocianina + naringenina diariamente)], cada grupo contendo seis coelhos.

No primeiro dia, os animais tiveram seus pesos medidos e foram dosados glicose e triacilgliceróis. Esse procedimento teve como objetivo verificar os níveis normais desses constituintes e o peso dos coelhos antes de lhes ser administrado aloxano.

Sete dias após a aplicação dessa droga, novas pesagens e dosagens foram realizadas, com a finalidade de verificar a indução de diabetes e, também, se os animais perderam peso. Nesse mesmo período, iniciaram-se os tratamentos com as substâncias-teste.

Aos 14, 21, 28 e 35 dias, esses procedimentos de pesagem e dosagem foram repetidos, para verificar se as substâncias-teste exerceram algum efeito sobre o peso corporal e sobre os níveis de triacilgliceróis e glicose dos animais.

Os resultados indicaram que a droga aloxano induziu hiperglicemia, hipertrigliceridemia e perda de peso corporal nos animais.

Com relação ao peso corporal, os resultados evidenciaram que a mistura de flavonóides (antocianina + naringenina) proporcionou ganho de peso considerável em animais diabéticos. Já com relação ao grupo que recebeu própolis, mesmo que seu ganho de peso não tenha sido relevante estatisticamente, pode-se dizer que, do ponto de vista biológico, ele é promissor quando comparado com o grupo diabético, que não recebeu tratamento. Isso indica certa tendência da própolis em proporcionar ganho de peso aos coelhos diabéticos.

Com relação ao teor de glicose, mesmo que os resultados não sejam estatisticamente consideráveis, pode-se dizer que eles são promissores, pois, quando foram comparados ambos os grupos-tratamento com o grupo-controle diabético, percebeu-se que tanto a própolis quanto a mistura de flavonóides reduziram os níveis elevados de glicose no sangue dos coelhos. A mistura de flavonóides apresentou certa vantagem, uma vez que passou a atuar mais cedo.

Quanto ao teor de triacilgliceróis, ambas as substâncias combateram a hipertrigliceridemia, porém se notou que, durante todo o ensaio (após a aplicação de aloxano), a própolis proporcionou reduções maiores do que a mistura dos dois flavonóides.

O segundo ensaio biológico foi realizado de maneira idêntica ao primeiro. No entanto, as substâncias testadas foram a própolis em forma de cápsulas de 150 mg e a antocianina em forma de cápsulas de 20 mg.

Os resultados, embora estatisticamente desconsideráveis, indicaram que tanto a própolis em cápsulas quanto a antocianina demonstraram certa tendência em proporcionar ganho de peso aos animais diabéticos, em comparação com o grupo-controle diabético.

Com relação ao teor de glicose, embora estatisticamente irrelevantes, os resultados evidenciaram certa tendência dessas substâncias em reduzir os níveis elevados de glicose dos coelhos diabéticos, em comparação com os

grupos-controle. Além disso, a antocianina indicou certa vantagem em relação à própolis, atuando mais cedo e reduzindo a quantidade de glicose. Somente aos 35 dias (fim do ensaio) é que a própolis superou a antocianina, mas de maneira discreta.

No tocante ao teor de triacilgliceróis, os resultados indicaram que ambas as substâncias atuaram diminuindo o teor elevado de triacilgliceróis dos coelhos diabéticos, ressaltando-se que a antocianina atuou de maneira mais significativa e mais cedo, proporcionando reduções maiores dos 14 aos 35 dias.

O terceiro ensaio teve como objetivo investigar se as substâncias testadas nos dois ensaios anteriores ocasionavam algum efeito adverso nos metabolismos mineral, protéico, lipídico e de carboidratos de coelhos saudáveis machos albinos da raça Nova Zelândia. Este experimento teve um período de 30 dias de duração, sendo as dosagens de alguns constituintes do sangue e as medidas de peso realizadas aos 0,15 e 30 dias.

No primeiro dia foram feitas dosagens e medidas de peso, com o objetivo de verificar os valores normais desses parâmetros antes da administração das substâncias aos coelhos.

Aos 15 e 30 dias, novas dosagens e pesagens foram feitas com a finalidade de verificar algum efeito sobre o metabolismo dos coelhos.

Os resultados indicaram que, de modo geral, as substâncias-teste (nas dosagens testadas) não ocasionaram alterações relevantes no metabolismo desses animais saudáveis.

Pode-se concluir, então, que as substâncias testadas neste experimento apresentaram certo potencial no combate à hiperglicemia e hipertrigliceridemia de coelhos diabéticos. Além disso, essas substâncias não ocasionaram efeitos adversos significativos no metabolismo de coelhos saudáveis. Isso leva a crer que tais substâncias podem se apresentar como futuros fármacos no combate à diabetes.

Diversos trabalhos têm atribuído tanto aos flavonóides quanto à própolis inúmeras propriedades farmacológicas. Isso quer dizer que se deve aproveitar ao máximo o potencial medicinal dessas substâncias e que o estudo dos seus efeitos em relação à diabetes, doença que aflige milhões de pessoas no mundo todo, deve continuar. O fato de que, neste experimento, alguns

resultados não tenham se apresentado significativos do ponto de vista estatístico não significa que não foram promissores do ponto de vista biológico. Uma sugestão para trabalhos futuros é que se prolonguem por mais tempo os ensaios e que se testem doses mais elevadas, procedimento que poderão proporcionar resultados interessantes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBATE, S.L., BRUNAEL, J.D. Pathophysiology of hyperlipidemia in diabetes mellitus. **J. Cardiovasc Pharmacol**, v.16 (suppl 9), p.51-57, 1990.
- AMOROS, M., SAUVAGER, F., GIRRE, L., CORMIER, M. *In vitro* antiviral activity of própolis. **Apidologie**, v.23, p.231-240, 1992.
- ANDRICH, G., FIORENTINI, R., CONSIGLIERI, A. Characteristics of some examples of própolis from the liganan coast. **Citta Api**, v.28, p.30-31; 34-35; 37-38, 1987.
- ANGELINI, G., VENA, G.A., MENEGHINI, C.L. Psoriasis and contact allergy to própolis. **Contact Dermatitis**, v.17, p.251-253, 1987.
- ARDUINO, F. **Conheça seu diabetes**. 5.ed. Rio de Janeiro: Expressão e Cultura, 1979. 196p.
- ARDUINO, F. **Diabetes mellitus**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1980. 125p.
- ARVOUET-GRAND, A., LEJEUNE, B., BASTIDE, P., POURRAT, A., LEGRET, P. Propolis extract. Part 6. Subacute toxicity and cutaneous primary irritation index. **Journal de Pharmacie de Belgique**, v.48, p.165-170, 1993.
- BANKOVA, V.S., POPOV, S.S., MAREKOV, N.L. A study on flavonoids of própolis. **J. Nat. Prod.**, v.46, p.471-474, 1983.
- BANKOVA, V.S., POPOV, S.S., MAREKOV, N.L. On the chemical composition of some própolis fractions with antiviral action. **Acta Microbiol. Bulg.**, v.23, p.52-57, 1988.

- BANKOVA, V.S., POPOV, S.S., MAREKOV, N.L. Isopentenil cinnamates from poplar buds and propolis. **Phytochemistry**, v.28, p.871-873, 1989.
- BATLOUNI, M. Hipótese oxidativa da arterosclerose e emprego dos antioxidantes na doença arterial coronária. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.68, n.1, p.55-63, 1997.
- BEHERA, H.N., PATNAIK, B.K. In vivo and in vitro effects aloxan on collagen characteristics of bone, skin and tendon of Swiss mice. **Gerontology**, v.25, n.5, p.255-260, 1979.
- BERETZ, A., ANTON, R., CAZENAVE, J. The effects of flavonoids on cyclic nucleotide phosphodiesterase. In: **Plant flavonoids in biology and medicine: biochemical, pharmacological and structure-activity relationships**. New York, USA: Alan R. Liss, 1986. p.281-296.
- BERETZ, A., CAZENAVE, J. **The effect of flavonoids on blood-vessel wall interactions**. In plant flavonoids in biology and medicine II: biochemical, cellular and medicinal properties. New York, USA: Alan R. Liss, 1988. p.187-200.
- BIRI, M., ALBERT, J.M.A. **Cria moderna de las abejas - manual practico**. Barcelona: Editorial de Vecchi, 1983. 287p.
- BOBBIO, F.O., BOBBIO, P.A. **Introdução à química de alimentos**. 2.ed. São Paulo: Varela, 1995. 223p.
- BOK, S.H., LEE, S.H., PARK, Y.B., BAE, K.H., SON, K.H., JEONG, T.S., CHOL, M.S. Plasma and hepatic cholesterol and hepatic activities of 3-hydroxy-e-metil-glutaryl-CoA reductase and acyl CoA: cholesterol transferase are lower in rats fed citrus peel extract or a mixture of citrus bioflavonoids. **J. Nutrient**, v.129, p.1182-1185, 1999.
- BONDY, P.K. Disorders of carbohydrate metabolism. In: **Duncan's-diseases of metabolism**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1969. p.225-267.
- BOURDILLAT, B., DELAUTIER, D., LABAT, J., BENVENISTE, J., POTIER, P., BRINK, C. **Mechanism of action of hispidulin, a natural flavone, on human platelets**. In plant flavonoids in biology and medicine II: biochemical, cellular and medicinal properties. New York, USA: Alan R. Liss, 1988. p.211-214.
- BRAVO, L., ABIA, R., EASTWOOD, M.A., SAURA-CALIXTO, F. Degradation of polyphenols (catechin and tannic acid) in the rat intestinal tract. Effect on colonic fermentation and faecal output. **Brit. J. Nutr.**, v.71, p.933-946, 1994.
- CAVALLINI, L., BINDOLI, A., SILIPRANDI, N. Comparative evaluation of antiperoxidative action of silymarin and other flavonoids. **Pharmacol. Res. Commun.**, v.10, p.133-136, 1978.

- CHAUHAN, U.P.S., RASTOGI, V.K., JAGGI, C.B. Protein metabolism in various tissues of aloxan diabetic rats. **Indian Journal Experimental Biology**, v.17, n.8, p.783-785, 1979.
- CIZMÁRIK, J., MATEL, I. Examination of the chemical composition of propolis. I. Isolation and identification of the 3,4- dihydroxycinnamic acid (caffeic acid) from propolis. **Experientia**, v.26, p.713, 1970.
- CODY, V. Crystal and molecular structure of flavonoids. In: **Plant flavonoids in biology and medicine II: biochemical, cellular, and medicinal properties**. New York, USA: Alan R. Liss, 1988. p.17-27.
- COOK, N.C., SAMMAN, S. Flavonoids- chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources- review. **The Journal of Nutrition Biochemistry**, v.7, n.1, p.66-76, 1996.
- CORTANI, G. Procedimento per la preparazione di un estrato di propoli. **Apic. Mod.**, v.78, p.147-150, 1987.
- CORTANI, G. Estrazione della frazione oleoresinosa della propoli ed esempi di utilizzazione di tale resina nella preparazione di propoli cosmetici. **Riv. Ital. Sostanze Gras**, v.68, p.99-100, 1991.
- CRANE, E. **Bees and beekeeping, science, practice and world resources**. New York: Cornell University Press, 1990. 614p.
- CRIQUI, M.H., RINGEL, B.L. Does diet or alcohol explain the French paradox? **Lancet.**, v.344, p.1719-1723, 1994.
- DAS, N.P. Studies on flavonoid metabolism: Absorption and metabolism of (+)-catechin in man. **Biochem. Pharmacol.**, v.20, p.3435-3445, 1971.
- DRENSKA, D., BANTUTOVA, I., OVCHAROV, R. Anti-convulsant effect of anthocyanins and antioxidants. **Farmatsiya**, v.39, p.454-457, 1989.
- DOBOWOLSKI, J.W., VOHORA, S.B., SHARMA, K., SHAH, S.A., NAQVI, S.A.H., DANDIYA, P.C. Antibacterial, antifungal, antiamebic, anti-inflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. **J. Ethnopharmacol**, v.35, p.77-82, 1991.
- DUARTE, J., VIZCAINO, F.P., UTRILLA, P., JIMENEZ, J., TAMARGO, J., ZARZUELO, A. Vasodilatory effects of flavonoids in rat aortic smooth muscle. Structure activity relationships. **Biochem. Pharmacol.**, v.24, p.857-862, 1993.
- FRAGA, C.G., MARTINO, V.S., FERRARO, G.E., COUSSIO, J.D., BOVERIS, A. Flavonoids as antioxidants evaluated by in vitro and in situ liver chemiluminescence. **Biochem. Pharmacol.**, v.36, p.717-720, 1987.

- FRENKEL, K., WEI, H., BRIMANI, R., YE, J., ZADUNAISKY, V.A., HUANG, M., FERRARO, T., CONNEY, A.H., GRUMBERGER, D. Inhibition of tumor promoter-mediated processes in mouse skin and bovine lens by caffeic acid phenethyl éster. **Cancer Res.**, v.53, p.1255-1261, 1993.
- FREUND, P.R., WASHAM, C.J., MAGGLON, M. Natural color for use in foods. **Cereal Foods World**, v.33, n.7, p.553-559, 1988.
- FRINHANI, E.M.D. **Efeito de antocianinas de uvas roxas (enocianinas) e de antocianinas extraídas de trapoeraba (*Tradescantia pallida*) em ratos normais e diabéticos.** Viçosa, MG: UFV, 1998. 91p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, 1998.
- GHISALBERTI, E.L. Propolis:a review. **Bee World**, v.60, p.59-84, 1979.
- GONZÁLEZ, R., CORCHO, I., REMIREZ, D., RODRÍGUEZ, S., ANCHETA, O., MERINO, N., GONZÁLEZ, A., PASCUAL, C. Hepatoprotective effects of propolis extract on carbon tetrachloride-induced liver injury in rats. **Phytother. Res.**, v.9, p.114-117, 1995.
- GORRAY, K.C., BASKIN, D.G., BRODSKY, J. Response of pancreatic B cells to alloxan and streptozotocin en the guinea pig. **Pancreas**, v.1, p.130-138, 1986.
- GRANGE, J.M., DAVEY, R.W. Antibacterial properties of propolis. **J. R. Soc. Med.**, v.83, p.159-160, 1990.
- GREENAWAY, W., SCAYSBROOK, T., WHATLEY, F.R., The composition and plant origins of propolis: a report of work at Oxford. **Bee World**, v.71, p.107-118, 1990.
- GREENAWAY, W., SCAYSBROOK, T., WHATLEY, F.R. Identification by gas chromatography-mass spectrometry of 150 compounds in propolis. **Ztsclu. Naturforsch.**, v.46, p.111-121, 1991.
- GRUNBERGER, D., BANERJEE, R., EISINGER, K. Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. **Experientia**, v.44, p.230-232, 1988.
- GRYGLEWSKI, R.J., KORBUT, R., ROBAK, J., SWIES, J. On the mechanism of antithrombotic action of flavonoids. **Biochem. Pharmacol.**, v.36, p.317-322, 1987.
- GUGLER, R., LESCHIC, M., DENGLER, H.J. Disposition of quercetin in man after single oral and intravenous doses. **Eur. J. Clin. Pharmacol**, v.9, p.229-234, 1975.
- HAY, K.D., GREIG, D.E. Própolis allergy: a cause of oral mucositis with ulceration. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.**, v.70, p.584-586, 1990.

- HANASAKI, Y., OGAWA, S., FUKUI, S. The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. **Free Radical Biol. Med.**, v.16, p.845-850, 1994.
- HARBORNE, J.B. Nature, distribution and function of plant flavonoids. In: **Plant flavonoids in biology and medicine: biochemical, pharmacological, and structure-activity relationships**. New York, USA: Alan R. Liss, 1986. p.15-24.
- HARBORNE, J.B. Flavonoids in the environment: structure-activity relationships. In: **Plant flavonoids in biology and medicine II: biochemical, cellular and medicinal properties**. New York, USA: Alan R. Liss, 1988. p.17-27.
- HAUSEN, B.M., WOLLENWEBER, E., SENFF, H., POST, B. Propolis allergy. I. Origin, properties, usage and literature review. **Contact Dermatitis**, v.17, p.163-170, 1987a.
- HAUSEN, B.M., WOLLENWEBER, E., SENFF, H., POST, B. Propolis allergy. II. The sensitizing properties of 1,1- dimethylallyl caffeic acid ester. **Contact Dermatitis**, v.17, p.171-177, 1987b.
- HAVSTEEN, B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. **Biochem. Pharmacol**, v.32, p.1141-1148, 1983.
- HERTOG, M.G.L., HOLLMAN, P.C.H., KATAN, M.B., KROMHOUT, D. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in the Netherlands. **Nutr. Cancer**, v.20, p.21-29, 1993.
- HEYNINGEN, V.R. Formation of polyols in the lens of rat with sugar cataract. **Nature**, v.184, p.194-195, 1959.
- HIGASHI, K.O., CASTRO, S.L. Propolis extracts are effective against *Trypanosoma cruzi* and have an impact on its interaction with host cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v.43, p.149-155, 1994.
- HIRONO, I., UENO, I., HOSAKA, S., TAKANASHI, H., MATSUSHIMA, T., SUGIMURA, T., NATORI, S. Carcinogenicity examination of quercetin and rutin in ACI rats. **Cancer Lett.**, v.13, p.15-21, 1981.
- HLADÓN, B., BYLKA, W., ELLNAIM-WOJTASZEK, M. *In vitro* studies on the cytostatic activity of propolis extracts. **Arzneim-Forsch Drug Res.**, v.30, p.1847-1848, 1980.
- HODNICK, W.F., MILOSAVLJEVIC, E.B., NELSON, J.H., PARDINI, R.S. Electrochemistry of flavonoids: relationships between redox potentials, inhibition of mitochondrial respiration and production of oxygen radicals by flavonoids. **Biochem. Pharmacol**, v.37, p.2607-2611, 1988.

- HOLLANDS, I., VIDAL, A., GRA, B., SOTOLONGO, M. Estudio evaluativo de la toxicidad subcrónica del propóleos cubano. **Rvta. Cub. Cienc. Vet.**, v.22, n.2, p.91-100, 1991.
- HOPE, W.C., WELTON, A.F., FIELDER-NAGY, C., BATULABERNARDO, C., COFFEY, J.W. In vitro inhibition of the biosynthesis of slow reacting substances of anaphylaxis (SRS-A) and lipoxygenase activity of quercetin. **Biochem. Pharmacol**, v.32, p.367-371, 1983.
- HOWARD, B.V. Lipoprotein metabolism in diabetes mellitus. **J. Lipid Res.**, v.28, p.613-628, 1987.
- HUANG, H.C., WENG, Y.I., LEE, C.R., JAN, T.R., CHEN, Y.L., LEE, Y.T. Protection by scoparone against the alterations of plasma lipoproteins, vascular morphology and vascular reactivity in hyperlipidaemic diabetic rabbit. **Br. J. Pharmacol**, v.110, p.1508-1514, 1993.
- HRYTSENKO, V.I., TYKHONOV, O.I., PRYAKHIN, O.R. Study of the polysaccharide preparation propolis, **Farmatsevychnyi zhurnal**, v.32, p.92-93, 1977.
- IRAN, R. **Natural products a laboratory guide**. 2.ed. San Diego: Academic Press, 1991. 360p.
- JAEGER, A., WALTI, M., NEFTEL, K. Side effects of flavonoids in medical practice. In: **Plant flavonoids in: biology and medicine II: biochemical. Cellular, and medical properties**. New York, USA: Alan R. Liss, 1988. p.379-394.
- JAHROMI, M.A.F., RAY, A.B. Antihyperlipidemic effect of flavonoids from *pterocarpus marsupium*. **Journal of Natural Products**, Índia, v.56, n.7, p.989-994, 1993.
- KANETO, H., FUJII, J., SEO, H.G., SUZUJI, K., MATSUOKA, T., NAKAMURA, M., TATSUMI, H., YAMASAKI, Y., KAMADA, T. Apoptotic cell death triggered by nitric oxide in pancreatic  $\beta$ -cells. **Diabetes**, v.44, p.733-738, 1995.
- KLEINHANS, D. Airborne contact dermatitis due to própolis. **Contact Dermatitis**, v.17, p.187-188, 1987.
- KRALL, L.P. **Manual do diabete de Joslin**. 11.ed. São Paulo: Livraria Roca, 1983. 32p.
- KUHNAU, J. The flavonoids. A class of semi-essential food components: Their role in human nutrition. **Wld. Rev. Nutr. Diet**, v.24, p.117-191, 1976.
- LEHNINGER, A.L. **Princípios de bioquímica**. 2.ed. São Paulo: Sarvier, 2000. 839p.

- LEITE, P.F., MARTINEZ, T.L.R., HALPERN, A. **Risco cardiovascular: fatores metabólicos e nutricionais, diagnósticos e tratamentos.** São Paulo: Loyola, 1994. 543p.
- LIMA, L.R.P. **Efeitos farmacológico, toxicológico e mecanismo de ação dos flavonóides e corantes naturais no metabolismo lipídico de coelhos.** Viçosa, MG: UFV, 2000. 115p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, 2000.
- LOPES, R.M., OLIVEIRA, T.T., NAGEM, T.J., PINTO, A.S. Farmacologia de flavonóides no controle hiperlipidêmico em animais experimentais. **Biotecnologia**, v.3, n.17, p.18-22, 2000.
- LUCÍRIO, I.D., WUSTHOF, R. A epidemia do sangue doce. **Super Interessante**, v.14, n.1, p.31-34, 2000.
- MACHACKOVA-TODOROVA, V., MANOLOVA, N., GEGOVA, G. Antiviral action of some fractions isolated from própolis. **Acta Microbiol. Bulg.**, v.17, p.79-84, 1985.
- MAHAN, L.K., KRAUSE, M.T.A. **Alimentos, nutrição e dietoterapia.** 8.ed. São Paulo: Roca, 1994. 957p.
- MANOLOVA, N.H., MAXIMOVA, V.A., GEGOVA, G.A. On the antiinfluenza action on fractions from propolis. **C. R. Bulg. Acad. Sci. Biologie (Virol)**, v.38, p.735-737, 1985.
- MARCIANO, C. **Efeito de amido da fruta da lobeira no controle de diabetes mellitus.** Viçosa, MG: UFV, 1997. 89p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, 1997.
- MARCUCCI, M.C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, v.26, p.83-99, 1995.
- MATSUNO, T., CHEN, C., BASNET, P. A tumouricidal and antioxidant compound isolated from an aqueous extract of propolis. **Med. Sci. Res.**, v.25, p.583-584, 1997.
- MATSUSHIGE, K., BASNET, P., HASE, K., KADOTA, S., TANAKA, K., NAMBA, T. Propolis protects pancreatic  $\beta$ - cells against the toxicity of streptozotocin (STZ). **Phytomedicine**, v.3, n.2, p.203-209, 1996.
- MILLER, N.J., RICE-EVANS, C.A. The relative contributions of ascorbic acid and phenolic antioxidants to the total antioxidant activity of orange and apple fruit juices and glack currant drink. **Food Chemistry**, v.60, n.3, p.331-337, 1997.
- MOHANAN, S., BOSE, S. Influence of streptozotocin and alloxan induced diabetes on the metabolism of dermal collagen in albino rats. **Acta Diabetologica**, v.18, n.3, p.251-258, 1981.

- MONTI, M., BERTI E., CARMINATTI, G., CUSINI, M. Occupational and cosmetic dermatitis from própolis. **Contact Dermatitis**, v.9, p.163, 1983.
- MORAZZONI, P., MAGISTRETTI, M.J. Effects of *Vaccinium myrtillus* anthocyanosides on prostacyclin-like activity in rat arterial tissue. **Fitoterapia**, v.57, n.1, p.11-14, 1986.
- MORDESS, J.P., ROSSINI, A.A. Animal models of diabetes. **The American Journal of Medicine**, v.70, p.353-360, 1981.
- MURAMATSU, K., FUKUYO, M., HARA, Y. Effect of green tea catechins on plasma cholesterol level in cholesterol-fed rats. **J. Nutr. Sci. Vitaminol.**, v.32, p.613-622, 1986.
- MURRAY, R.K., GRANNER, D.K., MAYES, P.A., RODWELL, V.W. **Harper: bioquímica**. 7.ed. São Paulo: Atheneu Editora São Paulo, 1994. 763p.
- NAGEM, T.J., OLIVEIRA, T.T.A., MIRANDA, L.C.G., PEREIRA, C.A.S. Efeitos de flavonóides sobre lipídeos em ratos e sobre enzimas metabolizadoras de drogas. **Arq. Biol. Tecnol.**, v.37, n.3, p.471-482, 1994.
- NAGEM, T.J., PEREIRA, W.L., OLIVEIRA, T.T., PINTO, A.S., OLIVEIRA, M.G.A., STRINGHETA, P.C. Efeitos de naringina e dos corantes naturais antocianina e carmim no metabolismo lipídico. **Rev. Bras. Farm.**, v.80, p.25-28, 1999.
- NEYCHEV, H., DIMOV, V., VULEVA, V. Immunomodulatory actino of propolis II. Effect of water-soluble fraction on influenza infection in mice. **Acta Microbiol. Bulg.**, v.23, p.58-62, 1988.
- NUNES, J.I. **Nutrição animal básica**. 1.ed. Belo Horizonte: Copiadora Breder Ltda., 1995. 334p.
- ODETTI, P.R., BORGOGGIO, A., PASCALE, A., ROLANDI, R., ADEZATI, L. Prevention of diabetes-increased aging effect on rat collagen-linked fluorescence by aminoguanidine and rutine. **Diabetes**, v.39, n.7, p.796-800, 1990.
- OLIVEIRA, T.T., NAGEM, T.J., MIRANDA, L.C.G., PAULA, V.F., TEIXEIRA, M.A. Inhibitory action on aldose reductase by soybean flavonoids. **J. Braz. Chem. Soc.**, v.8, n.3, p.211-213, 1997.
- OSOL, ARTHUR. **Dicionário médico blakiston**. 2.ed. São Paulo: Organização Andrei Editora LTDA. [s.d.]. 1169p.
- PALLARDO, J.P.M. **Advances in diabetes**. Madrid: Grupo Aula Médica S.A., 1997. 269p.
- PAZ, G., BITTENCOURT, A., CAMPOS, D.J., PERALTO, M.B., KOPPE, V.R. **Diabetes**, 2000. Disponível em: [http:// move.to/diabetes](http://move.to/diabetes).

- PINCKNEY, E.R., PINCKNEY, C. **The cholesterol controversy**. Los Angeles: Sherpoume, 1973. 162p.
- PYORAL, K., LAAKSO, M., UUSITUPA, M. Diabetes and atherosclerosis. An epidemiological view. **Diabetes Metab. Rev.**, v.3, p.463-528, 1987.
- RAVEN, P.H., EVERT, R.F., EICHHORN, S.E. **Biologia vegetal**. 5.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 1996. 728p.
- RATTY, A.K., DAS, N.P. Effects of flavonoids on nonenzymic lipid peroxidation: Structure activity relationship. **Biochem. Med. Metabol. Biol.**, v.39, p.69-79, 1988.
- ROBAK, J., KORBUT, R., SHRIDI, F., SWIES, J., RZADKOWSKA-BOLDALSKA, H. On the mechanism of antiaggregatory effect of myricetin. **Pol. J. Pharmacol. Pharm.**, v.40, p.337-340, 1988.
- ROSENGREN, A., WELIN, L., TSIPOGIANNI, A. Impact of cardiovascular risk factors on coronary heart disease and mortality among middle age diabetic men. A general populations study. **Br. Med. J.**, v.299, p.1127-1231, 1989.
- RUBIES PRAT, J., REVERTER, J.L., SENT, M. Calculated low density lipoprotein cholesterol should not be used or management of lipoprotein abnormalities in patients with diabetes mellitus. **Diabete Care**, v.16, p.1081-1086, 1993.
- SCHÉLLER, S., SZAFIARSKI, J., TUSTANOWSKI, E., NOLEWAJKA, E., STOJKA, A. Biological properties and clinical applications of propolis. VII. Investigation of the influence of ethanol extract of propolis (EEP) on cartilaginous regeneration. **Arzneim-Forsch/Drug Res.**, v.27, p.2138-2140, 1977.
- SHELLER, S., GAZDA, G., KROL, W., CZUBA, Z., ZAJUZZ, A., GABYS, J., SHANI, J. The ability of ethanolic extract of propolis to protect mice against gamma irradiation. **Z. Naturforsch.**, v.44c, p.1049-1052, 1989.
- SUDHEESH, S., PRESANNAKUMAR, G., VIJAYAKUMAR, S., VIJAYALAKSHMI, N.R. Hypolipidemic effect of flavonoids from *Solanum melongena*. **Plant Food Human Nutrition**, v.51, p.321-330, 1997.
- SWENSON, M.J. **DUKES – Fisiologia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. 799p.
- SOLOMONS, T.W.G. **Química orgânica 3**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1983. 1048p.
- STAMLER, J., VACCAROO, O., NEATON, J.D. Diabetes and other risk factors and 12 year cardiovascular mortality from screend for the Multiple Risk Factor Intervention Trial. **Diabetes Care**, v.16, p.434-444, 1993.

- STARZYK, J., SCHELLER, S., SZAFIARSKI, J., MOSKWA, M., STOJKO, A. biological properties and chemical application of propolis. II. Studies on the antiprotozoan activity of extract of propolis. **Arzneim-Forsch/Drug Res.**, v.27, n.1, p.1198-1199, 1997.
- STRYER, L. **Bioquímica**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 1000p.
- SWAIN, T. The evolution of flavonoids. In: **Plant flavonoids in biology and medicine: Biochemical, pharmacological, and structure-activity relationships**. New York, USA: Alan R. Liss, 1986. p.1-14.
- TAMURA, H., YAMAGAMI, A. Antioxidative activity of monoacylated anthocyanins isolated from muscat bailey a grape. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.42, n.8, p.1612-1615, 1994.
- TATEFUJI, T., IZUMI, N., OHTA, T., ARAI, S., IKEDA, M., KURIMOTO, M. Isolation and identification of compounds from brazilian propolis wich enhance macrophage Spreading and mobility. **Biol. Pharm. Bull.**, v.19, n.7, p.966-970, 1996.
- TAZAWA, S., WARASHINA, T., NORO, T., MYASE, T. Studies on the constituents of brazilian própolis. **Chem. Pharm. Bull.**, v.49, n.9, p.1477-1479, 1998.
- TIMBERLAKE, C.F., BRIDLE, P. Anthocyanins. In: WAFORD, J. (Ed.). **Developments in food colours**. London: Applies Science Publishers, 1980. p.115-149.
- TOSTI, A., CAPONERI, G.M., BARDAZZI, F., MELINO, M., VERONESI, S. Própolis contact dermatitis. **Contact Dermatitis**, v.12, p.227-228, 1985.
- TURK, J., CORBETT, J.A., RAMANADHAM, S., BOHRER, A., MCDANIEL, M.L. Biochemical evidence for nitric oxide formation from streptozotocin in isolated pancreatic islets. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, v.197, p.1458-1464, 1993.
- TZENG, S.H., KO, W.C., KO, F.N., TENG, C.M. Inhibition of platelet aggregation by some flavonoids. **Thromb. Res.**, v.64, p.91-100, 1991.
- VARELA, P., MUNOZ, R., Nutritional utilization of a low protein-diet in aloxan-diabetic rats. **Archivos Latinoamericanos de Nutrition**, v.40, n.3, p.349-359, 1990.
- VARMA, S.D., KINOSHITA, J H. Inhibition of lens aldose reductase by flavonoids. Their possible role in the prevention of diabetic cataracts. **Biochem. Pharmacol**, v.25, p.2505-2513, 1976.

- VILLANUEVA, V.R., BOGDANOVSKY, D., BARBIER, M., GONNET, M., LAVIE, P. Sur l'isolement et l'identification de la 3,5,7- trihydroxy flavone (galangine) a partir de la propolis. **Ann Ins Pasteur**, v.106, p.292-302, 1964.
- VILLANUEVA, V.R., BARBIER, M., GONNET, M., LAVIE, P. Les flavonoids de la propolis: isolement d'une nouvelle substance bacteriostatique: la pinocembrine [dihydroxy- 5,7 flavanone]. **Ann Inst Pasteur**, v.118, p.84-87, 1970.
- VOLPERT, R., ELSTNER, E.F. Biochemical activity of propolis extracts II. Photodynamic activities. **Z. Naturforsch**, v.48c, p.858-862, 1993.
- VOLPERT, R., ELSTNER, E.F. Interactions of different extracts of propolis with leukocytes enzymes. **Arznein-Forsch/Drug Res.**, v.46, p.47-51, 1996.
- UCHIGATA, Y., YAMAMOTO, H., KAWAMURA, A., OKAMOTO, H. Protection by superoxide dismutase, catalase, and poly(ADP-ribose) synthetase inhibitors against alloxan and streptozotocin induced islet DNA strand breaks and against the inhibition of proinsulin synthesis. **J. Biol. Chem.**, v.257, p.6084-6088, 1982.
- YOUNG, E. Sensitivity to propolis. **Contact Dermatitis**, v.16, p.49-50, 1987.

