

Avaliação do colesterol plasmático em coelhos com hipercolesterolemia induzida e tratados com extrato etanólico de própolis.

Fernandes, A. A. H.¹; Alves, M. J. F.²; Boteon, E. M.¹; Rosa, G. J. M.³; Silva, C. E. F.¹

¹Depto. de Química e Bioquímica-UNESP-Campus de Botucatu, angelica@ibb.unesp.br, ²Depto. de Fisiologia-IB/UNESP-Campus de Botucatu, zeze@ibb.unesp.br, ³Depto. de Bioestatística-IB/UNESP-Campus de Botucatu, Distrito de Rubião Jr., CEP 18618 000, Botucatu, SP.

RESUMO: Os produtos apícolas têm despertado o interesse do homem desde o início das civilizações, entre estes destaca-se a própolis, rica em flavonóides, com alto poder antioxidante, tendo portanto, ação protetora às lipoproteínas LDL-colesterol contra a lipoperoxidação. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito do extrato etanólico de própolis sobre o nível plasmático de colesterol em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) submetidos a hipercolesterolemia. Os animais foram divididos em 4 grupos: G₁= receberam ração comercial e água, G₂= receberam ração suplementada e água, G₃= receberam ração suplementada e álcool e G₄= ração suplementada e extrato etanólico de própolis. A hipercolesterolemia foi induzida com ração suplementada, preparada a partir da ração comercial enriquecida com gema de ovo. Os animais receberam o extrato etanólico de própolis a 30% (30g de própolis em 100mL de etanol) na concentração de 100 mg/kg diariamente, por via oral. Semanalmente, após jejum de 14 horas, as amostras de sangue foram coletadas pela veia marginal da orelha, nas quais determinou-se o níveis plasmáticos de colesterol total. Através dos resultados obtidos constatou-se que o extrato etanólico de própolis reduziu significativamente ($p < 0,05$) a concentração plasmática de colesterol total (109,59mg/dL) nos animais com hipercolesterolemia induzida (G₄), comparativamente a G₂ (269,74mg/dL) e a G₃ (331,38 mg/dL), que não diferiram entre si ($p > 0,05$). Enquanto que os animais do grupo G₁, mantiveram este parâmetro bioquímico na faixa da normalidade (35,10 mg/dL).

Palavras-chave: própolis, flavonóides, hipercolesterolemia induzida, coelho.

ABSTRACT: Effect of the ethanolic propolis on the cholesterol level in rabbits with induced hypercholesterolaemia. The propolis (bee glue) is a product rich in flavonoids, which are known for antioxidant activities, a protective action to the lipoproteins LDL-cholesterol against lipid peroxidation. Because they have antioxidant properties, we investigated the effect of the ethanolic extract propolis on the plasma level of cholesterol in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) submitted to hypercholesterolaemia. The animals were divided into 4 groups. G₁=received commercial feed and water, G₂= received enriched feed and water, G₃=received enriched feed and ethanol, G₄=received enriched feed and ethanolic extract of propolis. The hypercholesterolaemia was induced with commercial feed enriched with egg yolk. The animals received the ethanolic extract propolis at the concentration of 100 mg/kg daily. Weekly, after fast of 14 hours, the samples of blood were collected from the marginal vein of the ear. The plasma was used for the estimation total cholesterol. From the results obtained, we verified that the ethanolic extract propolis significantly reduced the plasma level cholesterol (109,59 mg/dL, $p < 0,05$), compared to the animals treated with ethanol (331,38 mg/dL), and also to those receiving the commercial feed only, with cholesterol at 269,74 mg/dL.

Key words: propolis, flavonoids, induced hypercholesterolaemia, rabbits.

INTRODUÇÃO

Dentre os produtos apícolas, a própolis vem despertando interesse pelo potencial benéfico à saúde humana, originando assim importante ramo da medicina denominado apiterapia (Funari *et al.*, 1998). A própolis é o nome genérico dado à resina coletada de diversas fontes vegetais e processada por abelhas, sendo transportada para o interior da colméia para ser utilizada como meio de defesa (Koo & Park, 1996).

Estudos qualitativos, sobre a composição química da própolis, revelaram as seguintes proporções básicas: 55% resinas, 30%

ceras, 10% óleo voláteis e 5% de pólen. Também observou-se teores consideráveis de flavonóides, ácido caféico, vitaminas e sais mineirais (Szewezark & Goddy, 1984), aminoácidos, principalmente arginina e prolina (Gabrys *et al.*, 1988). Sendo que a proporção dos componentes varia em função da flora predominante da região, época de coleta e da espécie da abelha (Bankova *et al.*, 1992, Soler *et al.*, 1995, Koo & Park, 1996). A presença de compostos fenólicos, principalmente os flavonóides (quercetina), considerados o grupo químico predominante da própolis, explica, em parte, as diversas atividades biológicas do produto apícola (Markham *et al.*, 1996, Matsuno, 1997).

Recebido para publicação em 21/03/00 e aceito para publicação em 03/03/02.

Assim, este apiterápico tem-se destacado em função das inúmeras propriedades terapêuticas tais como: ação antimicrobiana, antiviral, anti-inflamatória, imunomodulatória, hipoglicemiante, ação protetora em miocardiopatias induzidas em ratos, dentre outras (Havsteen, 1983; Szezewark & Goody, 1984; Chopra *et al.*, 1995; Bankova *et al.*, 1992; Tatefuji *et al.*, 1996). A associação entre hiperlipidemia e doença coronariana está bem estabelecida e fundamenta-se principalmente no papel do colesterol no desenvolvimento da aterosclerose (Posadas-Romero, 1995). O acúmulo das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) sobre a membrana endotelial, torna-se fator de risco para a aterosclerose e doenças cardiovasculares (Goldstein & Brown, 1987). Por outro lado, a fração HDL (lipoproteína de alta densidade) impede este depósito, uma vez que atua transportando o excesso de colesterol dos tecidos extra-hepáticos para o fígado (Millner, 1990 e Whitney, 1994). Embora a patogênese dessa enfermidade seja complexa, um dos fatores determinantes reside na lipoperoxidação das LDL-colesterol, elevando, desta forma, a endocitose pelos macrófagos, presentes na parede arterial, promovendo seu depósito neste local (Princen *et al.*, 1998). Desse modo ocorre o desenvolvimento da placa aterosclerótica e consequentemente elevando o risco de acidentes cardiovasculares.

Muitos flavonóides, são considerados como agentes anti-aterogênicos por serem importantes substâncias antioxidantes (Hertog, *et al.* 1997 e Ramírez-Tortosa *et al.* 1999). A quercetina, um dos muitos flavonóides encontrados na própolis, tem se mostrado como potente inibidor oxidativo dos ácidos graxos poliinsaturados dos fosfolípidios, que entram na constituição das lipoproteínas de baixa densidade (Rimm, *et al.* 1996). Desta forma, a estrutura das LDL-colesterol permanece inalterada, podendo ser reconhecidas através da sua apolipoproteína pelas células-alvo, reduzindo o nível dessa lipoproteína no plasma (Yugarani *et al.*, 1996, Mathiesen, *et al.*, 1996 e Carrero *et al.*, 1998).

De acordo com o exposto e considerando-se as inúmeras propriedades farmacológicas da própolis o presente trabalho teve como objetivo verificar o efeito do extrato etanólico de própolis sobre o nível plasmático de colesterol em coelhos submetidos à dieta suplementada com gema de ovo (dieta enriquecida de colesterol).

MATERIAL E MÉTODO

1- Instalação do Experimento e Animais Experimentais

O experimento foi instalado no biotério do Departamento de Fisiologia - IB-UNESP/

Campus de Botucatu. Foram utilizados coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) machos, com idade aproximada de 50 dias, pesando em média 1.300g. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central pertencente ao "Campus de Botucatu" - UNESP.

2- Extrato Etanólico de Própolis

2.1- Preparo do Extrato Etanólico de Própolis

A própolis foi fornecida pelo Departamento de Zootecnia-FCA UNESP/ Campus de Botucatu. As amostras de própolis, na forma bruta foram recolhidas e acondicionadas em sacos plásticos durante os meses de fevereiro e março de 1999. Em seguida foram mantidas congeladas (-4°C) por 3 ou 4 dias. Após este período, foram trituradas em liquidificador, a fim de obter-se um produto com maior capacidade de homogeneização com o solvente.

Os extratos etanólicos de própolis (EEP) foram preparados na concentração de 30% (30 g de própolis em 100 mL de etanol absoluto - MERCK), de acordo com Sforcin (1996).

3- Formulação da Ração Suplementada

A ração suplementada foi formulada no Laboratório Experimental do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina de Botucatu (Camacho *et al.*, 1997).

4- Grupos Experimentais

Inicialmente todos os animais foram mantidos durante 7 dias no Biotério onde se realizou a experimentação, com a finalidade de adaptação ao novo ambiente. Os animais foram escolhidos aleatoriamente e distribuídos em gaiolas metabólicas, os quais foram divididos em 4 grupos:

G₁ - grupo controle água (n=2) – os animais receberam ração comercial e água, durante o período experimental de 126 dias (fases 1, 2, e 3),

G₂ - grupo controle suplementado (n=2) - os animais receberam ração comercial e água durante 35 dias (fase 1), após este período receberam ração suplementada (com dieta rica em colesterol) e água, durante 91 dias (fases 2 e 3),

G₃ - grupo controle álcool (n=2) – os animais receberam ração comercial e água, durante 35 dias (fase1), após este período receberam ração suplementada e água, durante 91 dias (fases 2 e 3). Sendo que 49 dias de suplementação (Fase 2), os animais passaram a receber solução hidroalcoólica (fase 3) na concentração de 3,8 mL de etanol e m 150 mL de água, com o objetivo de verificar um possível efeito do veículo em que a própolis se encontra.

G₄ - grupo tratado (n=2) - os animais receberam ração comercial e água, durante 35 dias (fase 1),

após este período receberam ração suplementada e água, durante 91 dias (fase 2 e 3). Após 49 dias de suplementação (com dieta rica em colesterol), os animais passaram a receber solução etanólica de própolis (fase 3), em substituição a água.

A solução etanólica de própolis foi administrada, diariamente por via oral (diluída na água de beber), a 30% na concentração de 100 mg/kg (Merino et al., 1996).

5 - Procedimento do Experimento

Os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas individuais, os quais receberam diariamente 150g de ração, 150 mL de água e os tratamentos acima descritos. As amostras de sangue foram coletadas semanalmente, após padronização de um determinado dia da semana. O sangue foi coletado através da veia marginal da orelha dos coelhos submetidos ao jejum de 14 horas. O plasma foi obtido através de centrifugação do sangue a 3.000 rpm por 20 minutos.

6 - Determinações Bioquímicas

No plasma determinou-se o colesterol total, utilizando-se "Kits" (CELM) na seguinte preconização:

Colesterol total: segundo método enzimático-colorimétrico (colesterol esterase/colesterol e oxidase/peroxidase) de acordo com Leffler, Mac

Doygald (1963).

7- Análise Dos Resultados - Delineamento Estatístico

O estudo estatístico do nível plasmático de colesterol total dos coelhos referentes aos 4 grupos experimentais, com 2 repetições para os grupos 1, 2 e 3 e com 3 repetições para o grupo 4, foi realizado a partir da técnica da análise de variância para experimento inteiramente casualizado com parcelas subdivididas no tempo (Mead, 1988).

A análise estatística foi implementada utilizando-se o procedimento Mixed do programa computacional SAS (Littell et al., 1996), e todos os resultados foram discutidos ao nível de 5% de significância.

RESULTADO E DISCUSSÃO

A Tabela 1 e Figura 1 mostram os resultados médios obtidos para o nível plasmático de colesterol total nas três fases analisadas.

A concentração de colesterol total no plasma não diferiu significativamente entre os grupos experimentais analisados na fase 1, permanecendo este parâmetro na faixa da normalidade.

TABELA 1. Valores médios obtidos para o nível plasmático de colesterol total (mg/dL) dos coelhos referentes aos quatro grupos experimentais, avaliados em três fases.

Grupos Experimentais	Fases		
	F ₁	F ₂	F ₃
G ₁	73,29±19,79a ⁽¹⁾ A ⁽²⁾	46,69± 4,17aA	35,10±1,81aA
G ₂	56,93±1,76aA	165,30±85,36bB	269,74±37,54cC
G ₃	60,19±5,38aA	227,57±83,93bB	331,38±39,16cC
G ₄	67,19±1,81aA	212,14±27,81bB	109,59±13,90bA

CV = 24,88%

(1) Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem quanto aos grupos, em cada fase considerada, ao nível de 5% significância.

(2) Médias seguidas de mesma letra, maiúscula não diferem quanto às fases, em cada grupo estudado, ao nível de 5% significância.

Quando os animais passaram a receber a dieta enriquecida com gema de ovo, na fase 2, o nível de colesterol nos animais pertencentes aos grupos G₂, G₃ e G₄, elevou-se de forma significativa, tanto em relação ao grupo controle (G₁) como à fase anterior.

Os animais submetidos ao tratamento com extrato etanólico de própolis (G₄) apresentaram queda significativa no nível

plasmático de colesterol (fase 3), comparativamente tanto àqueles animais que receberam solução etanólica (G₃) como àqueles submetidos somente à dieta suplementada com colesterol (G₂). Diante disso, fica evidente que os componentes da própolis tiveram ação redutora no nível de colesterol, podendo, portanto, eliminar o efeito do etanol sobre a redução deste parâmetro, uma vez que a concentração de colesterol nos animais do grupo G₃ continuou aumentando na fase 3.

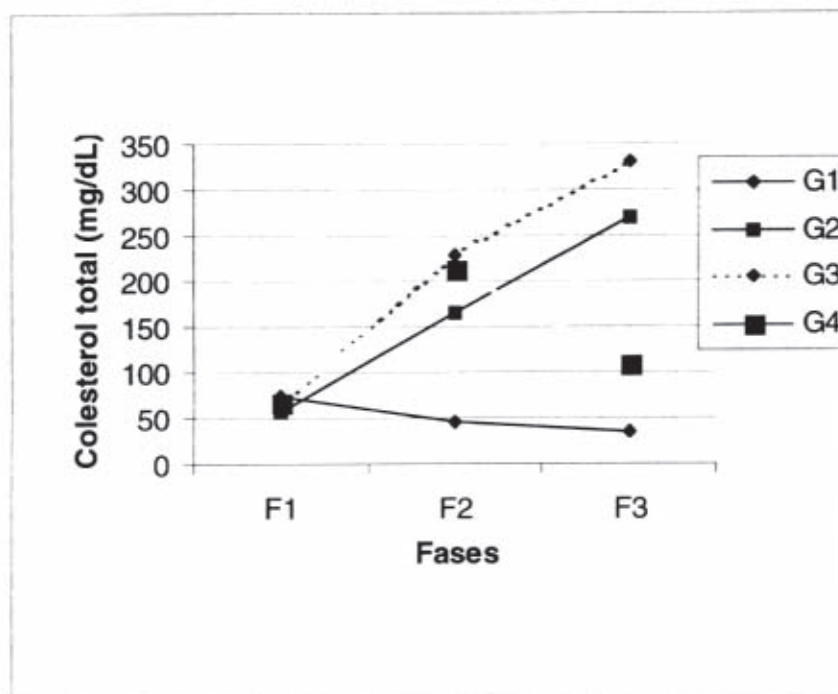


FIGURA 1 – Valores médios obtidos para o nível plasmático de colesterol (mg/dL), nos quatro grupos experimentais e nas três fases analisadas

Diante disso, fica evidente que os componentes da própolis tiveram ação redutora no nível de colesterol, podendo, portanto, eliminar o efeito do etanol sobre a redução deste parâmetro, uma vez que a concentração de colesterol nos animais do grupo G₃ continuou aumentando na fase 3.

A literatura relata a existência de grande quantidade de flavonóides, principalmente a quercetina, na própolis, e sabe-se que estes compostos apresentam propriedades antioxidantes (Matsuno, 1997). A diminuição no nível de colesterol nos animais tratados com a própolis pode associar-se a ação antioxidante dos flavonóides, presentes na própolis. Assim sendo, as lipoproteínas de baixa densidade (LDL-colesterol) estariam protegidas contra os efeitos deletérios da oxidação e o seu reconhecimento pelas células-alvo estaria assegurado, o que provocaria a sua redução no plasma (Carrero *et al.*, 1998 e Nilgdkar *et al.*, 1998). Resultados semelhantes foram observados por Conquer *et al.* (1998), os quais relataram que dietas contendo flavonóides, correlacionaram-se inversamente à incidência de acidentes cardiovasculares, por diminuir o nível de colesterol.

Outras hipóteses podem explicar tal redução, como por exemplo o fato dos flavonóides diminuírem a atividade da HMG-CoA redutase, reduzindo os níveis tanto hepático como sérico de colesterol (Bok *et al.*, 1999) e aumentarem o nível de HDL-colesterol em ratos submetidos às dietas enriquecidas com colesterol (Igarashi & Ohnuma, 1995).

CONCLUSÃO

O extrato etanólico de própolis reduziu o nível plasmático de colesterol total simultaneamente à ingestão de dieta suplementada com colesterol, ou seja, à indução da hipercolesterolemia em coelhos.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- BANKOVA, V., DYULGEROY, A., POPOV, S., EVSTATIEVA, L., KULEVA, L., PUREB, O., ZAMJANSAN, Z. Própolis in Bulgaria and Mongolia: phenolic compounds and plant origin. *Apidologie*, v.23, p.79-85, 1992.
- BOK, S.H., LEE, S.H., PARK, Y.B., BAE, K.H., SON, K.H., JEONG, T.S., CHOI, M.S. Plasma and hepatic cholesterol and hepatic activities of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coa reductase and acyl CoA: cholesterol transferase are lower in rats fed citrus peel extract or a mixture of citrus bioflavonoids. *Journal of Nutrition*, v.129, n.6, p.1182-5, 1999.
- CAMACHO, R.D. Ação da berinjela (*Solanum melongena*) sobre os níveis de colesterol plasmático em coelhos. Londrina, 1996. 37 p. Monografia (conclusão do curso em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina.
- CARRERO, P., ORTEGA, H., MARTINEZ-BOTAS, J., GOMEZ-CORONADO, D., LASUNCION, M.A. Flavonoid-induced ability of minimally modified low-density lipoproteins to support lymphocyte proliferation. *Biochemical Pharmacology*, v.55, n.7, p.1125-9, 1998.

- CONQUER, J.A., MAIANI, G., AZZINI, E., RAGUZZINI, A., HOLUB, B.J. Supplementation with quercetin markedly increases plasma quercetin concentration without effect on selected risk factors for heart disease in healthy subjects. **Journal of Nutrition**, v.128, p.593-7, 1998.
- CHOPRA, S., PILLAI, K.K., HUSAIN, S.Z., GIRI, D.K. Propolis protects against doxorubicin-induced myocardiopathy in rats. **Experimental and Molecular Pathology**, v.63, n.3, p.190-8, 1995.
- FUNARI, S.R.C., ROCHA, H.C., FERNANDES, A., SFORCIN, J.M. Número de bactérias em função do método de secagem do pólen. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 35, 1998, Botucatu. **Resumos...** Botucatu, 1998. p.525-27.
- GABRYS, J., KONECKI, J., KROL, W. Free aminoacids in bee hive product (propolis) as identified and quantified by gas-liquid chromatography. **Pharmacological Research Communications**, v.18, n.6, p.513-18, 1988.
- GOLDSTEIN, J.L., BROWN, M.S. The low density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. **Annual Review of Biochemistry**, v.46, p.897-930, 1987.
- HAVSTEEN, B. Flavonoids. A class of natural products of high pharmacological potency. **Biochemical Pharmacology**, v.32, p.1141-8, 1983.
- HERTOG, M.G., SWEETNAM, P.M., FEHILY, A.M., ELWOOD, P.C., KROMHOUT, D. Antioxidant flavonols and ischemic heart disease in a Welsh population of men: the Caerphilly Study. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.65, p.1489-94, 1997.
- IGARASHI, K., OHMUMA, M., Effects of isorhamnetin, rhamnetin, and quercetin on the concentrations of cholesterol and lipoperoxide in the serum and liver and on the blood and liver antioxidative enzyme activities of rats. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v.59, p. 595-601, 1995.
- KOO, M.H., PARK, Y.K. Investigação do teor de flavonóides nas própolis comerciais. **Revista Brasileira de Apicultura**, v.6, n.13, p.6-7, 1996.
- LEFFLER, H.H., MAC DOY GALT, H. Estimation of cholesterol in serum. **American Journal of Clinical Pathology**, v.39, p.311-15, 1963.
- LITTELL, R.C., MILLIKEN, G.A., STROUP, W.W., WOLFINGER, R.D. **SAS System for mixed models**. Cary, NC: SAS Institute Inc., 1996. 633p.
- MARKHAM, K.R., MITCHELL, K.A., WILKINS, A.L., DALDY, J.A., LU, Y. HPLC and GC-MS identification of the major organic constituents in New Zealand propolis. **Phytochemistry**, v.42, n.1, p.205-11, 1996.
- MATHIESEN, L., MALTERUD, K.E., NENSETER, M.S., SUND, R.B. Inhibition of low density lipoprotein oxidation by myricetin, a naturally occurring flavonoid. **Pharmacology, Toxicology**, v.78, p.143-6, 1996.
- MATSUNO, T. Composição da própolis. In: _____. **O efeito terapêutico da própolis**. São Paulo: ABAETÉ - Copiadora e gráfica LTDA, 1997. p.19-21.
- MEAD, R. **The design of experiments**. Cambridge: Cambridge University Press, 1998. 620p.
- MERINO, N., GONZALEZ, R., GONZALEZ, A., REMIRIZ, D. Histopathological evaluation on effect of red propolis on liver damage induced by CCl₄ in rats. **Archives of Medical Research**, v. 27, p. 285-9, 1996.
- MILLNER, N.E. Raising high density lipoprotein cholesterol: the biochemical pharmacology of reverse cholesterol transport. **Biochemical Pharmacology**, v.40, p.403-10, 1990.
- NIGDIKAR, S., WILLIAMS, N. R., GRIFFIN, B.A., HOWARD A.N. Consumption of red wine polyphenols reduces the susceptibility of low-density lipoproteins to oxidation in vivo. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 68, p.258-65, 1998.
- PRINCEN, H.M., VAN-DUYVENVOORDE, BUYTENHEK, R., BLONK, C., TIJBURG, L.B., LANGIUS, J.A., MEINDERS, A.E., PIJL, H. No effect of consumption of green and black tea on plasma lipid and antioxidant levels and on LDL oxidation in smokers. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v.18, n.5, p.833-41, 1998.
- POSADAS-ROMERO, C. Cholesterol levels and prevalence of hypercholesterolemia in a Mexican adult population. **Atherosclerosis**, v.118, p.275-84, 1995.
- RAMÍREZ-TORTOSA, C., PEDROSA, J.M.L., SUAREZ, A., ROS, E., MATAIX, J., GIL, A. Olive oil and fish oil-enriched diets modify plasma lipids and susceptibility of LDL to oxidative modification in free-living male patients with peripheral vascular disease: the Spanish Nutrition Study. **British Journal of Nutrition**, v.82, p.31-9, 1999.
- RIMM, E.B., KATAN, M.B., ASCHERIO, A., STAMPFER, M.J., WILLETT, W.C. Relation between intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and risk for coronary heart disease in male health professionals. **Annals of Internal Medicine**, v.125, p.384-9, 1996.
- SFORCIN, J.M. **Efeito da Sazonalidade sobre as Propriedades Imunomoduladoras e Antibacteriana da Própolis e Perfil Bioquímico de Ratos**. Botucatu, 1996. 63p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.
- SOLER, C., GIL, M., GARCIA, V.C., TOMAS-BARBERAN, F.A. Flavonoid patterns of French honeys with different floral origin. **Apidologie**, v.26, n.1, p.53-60, 1995.
- SZEWEZARK, E.H., GOODY, G.F. Um estudo científico sobre a própolis. **Apicultura no Brasil**, v.3, p.28-9, 1984.
- TATEFUJI, T., IZUMI, N., OHTA, T., ARAI, S., IKEDA, M., KURIMOTO, M. Isolation and identification of compounds from Brazilian propolis which enhance macrophage spreading and mobility. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.19, n.7, p.966-70, 1996.
- YUGARANI, T., TAN, B.K.H., TEH, M., DAS, N.P. Effects of polyphenolic natural products on the lipid profiles of rats fed high fat diets. **Lipids**, v.27, p.181-6, 1996.
- WHITNEY, N.E. Nutrition and disorders of the blood vessels, heart, and lungs. In: _____. **Understanding normal, clinical nutrition**. 4 ed. Minneapolis: West Publishing Company, 1994. chap. 27, p.879-909.