



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Campus de Araraquara

PAULO FERNANDO CARLSTROM

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA PRÓPOLIS VERMELHA BRASILEIRA
COADMINISTRADA COM METFORMINA EM MODELO DE OBESIDADE E
RESISTÊNCIA À INSULINA

Araraquara, SP

2024

PAULO FERNANDO CARLSTROM

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA PRÓPOLIS VERMELHA BRASILEIRA
COADMINISTRADA COM METFORMINA EM MODELO DE OBESIDADE E
RESISTÊNCIA À INSULINA**

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, para obtenção do título de Doutor em Ciências, no Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.

Área de Concentração: Análises Clínicas

Orientador: Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti

Coorientadora: Profa. Dra. Amanda Martins Baviera

Araraquara, SP

2024

-
- C284a** Carlstrom, Paulo Fernando.
Avaliação dos efeitos da própolis vermelha brasileira
coadministrada com metformina em modelo de obesidade e resistência
à insulina / Paulo Fernando Carlstrom. – Araraquara, 2024.
107 f. : il.
- Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara. Programa de Pós-
graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área
de concentração: Análises Clínicas.
- Orientador: Iguatemy Lourenço Brunetti.
Coorientadora: Amanda Martins Baviera.
1. Diabetes mellitus. 2. Dieta ocidental. 3. Estresse glico-oxidativo.
4. Produtos apícolas. 5. Terapia combinada. I. Brunetti, Iguatemy
Lourenço, orient. II. Baviera, Amanda Martins, coorient. III. Título.

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara
Kazumi Tomoyose - CRB 8/10904

CAPES: 33004030081P7
Esta ficha não pode ser modificada

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Avaliação dos efeitos da própolis vermelha brasileira coadministrada com metformina em modelo de obesidade e resistência à insulina

AUTOR: PAULO FERNANDO CARLSTROM

ORIENTADOR: IGUATEMY LOURENCO **BRUNETTICO****ORIENTADORA:** AMANDA MARTINS BAVIERA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Ciências, área de conhecimento: Bioquímica pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. AMANDA MARTINS BAVIERA (Participação Virtual)
Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da Unesp

Prof. Dr. ANDERSON MARLIERE NAVARRO (Participação Virtual)
Departamento Ciências da Saúde / Faculdade de Medicina do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP)

Profa. Dra. ANALUCIA RAMPAZZO XAVIER (Participação Virtual)
Centro de Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal Fluminense (UFF)

Prof. Dr. JOSÉ MAURICIO SFORCIN (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Químicas e Biológicas / Instituto de Biociências do Campus de Botucatu da Unesp

Araraquara, 18 de dezembro de 2024.

Agradecimentos

À minha mãe, Eugênilha, por todo o amor e apoio que me ofereceu ao longo da minha trajetória acadêmica. Seu exemplo de perseverança e resiliência para com o seu trabalho foram a minha força nos momentos de desafio, e seu incentivo foi a luz que iluminou meu caminho quando eu mais precisei. Obrigado por estar sempre ao meu lado, acreditando nos meus sonhos e me lembrando do meu potencial. Esta conquista é tanto minha quanto sua, e sou eternamente grato por tudo o que fez por mim. Espero um dia poder retribuir à altura.

Ao meu amigo Breno, por toda a amizade e irmandade ao longo da vida. Esteve presente em cada etapa, acadêmica ou pessoal, tornando tudo único e especial. Desejo que nossa amizade perdure, independentemente do tempo ou do lugar em que estivermos.

Ao Professor Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti, pela oportunidade, apoio e contribuição, e por semear a visão e conhecimentos de um pesquisador com grandes conhecimentos e experiência de vida. Isso é transformador.

À Professora Dra. Amanda Martins Baviera, pela oportunidade, suporte e paciência ao longo de todo o projeto. Sua orientação foi fundamental para o desenvolvimento do trabalho. Agradeço pela dedicação e generosidade em compartilhar seu conhecimento, sempre com atenção e respeito.

Aos meus companheiros e amigos de laboratório, Tainá, Ingrid, André, Felipe, Renata, Beatriz, Sérgio e Amanda. Foram muitos momentos de alegria e diversão, como também de muito trabalho e dedicação, que fizeram cada minuto valer a pena. Um bom trabalho é resultado de um esforço coletivo. Sozinho eu não teria conseguido.

À Juliana, Camila e Ana Carolina, pelo apoio e suporte em diversos momentos importantes, apesar do breve tempo em que convivemos.

Aos professores Masaharu, Pedro e Severino, por gentilmente fornecer a amostra de própolis vermelha utilizada durante todo o trabalho. A oportunidade de trabalhar com esse material instigou minha curiosidade científica e me incentivou a dedicar todo esforço neste aprendizado.

Aos camundongos utilizados nesta pesquisa, minha mais profunda gratidão e respeito. A contribuição deles foi essencial para o avanço deste estudo, e sou plenamente consciente do sacrifício envolvido. Espero que os conhecimentos

obtidos aqui possam honrar a vida desses animais, trazendo benefícios para a ciência e para a saúde, em um compromisso de valorizar e respeitar cada ser envolvido na busca pelo conhecimento.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa de pesquisa (processo 140178/2021-0).

"Você é mais corajoso do que acredita, mais forte do que parece e mais esperto do que pensa."

(Ursinho Pooh)

"Quando a educação não é libertadora, o sonho do oprimido é ser o opressor."

(Paulo Freire)

Resumo

A obesidade desempenha um papel fundamental no desenvolvimento do diabetes mellitus (DM) e suas complicações, como a hiperglicemia, devido a mudanças no estilo de vida e ao impacto das dietas ricas em lipídeos, contribuindo para o estresse glico-oxidativo, que leva a danos nas biomoléculas, resistência à insulina e inflamação de baixo grau. A metformina é o tratamento padrão para o DM tipo 2, mas também se busca combinar compostos bioativos naturais que combatam os efeitos prejudiciais do estresse glico-oxidativo. Neste contexto, investigamos os efeitos do extrato hidroetanólico de própolis vermelha brasileira (PVB) incorporada em iogurte, sozinha ou coadministrada com metformina, em um modelo de obesidade e resistência à insulina induzida por consumo de dieta hiperlipídica (35% de lipídios). Utilizamos camundongos machos (C57BL/6j) divididos em 7 grupos: dieta padrão, tratados com água (P) ou com PVB 100 mg/kg (PP); dieta hiperlipídica, tratados com: água (HL), iogurte (HI), PVB 100 mg/kg (HP), metformina 50 mg/kg (HM), PVB 100 mg/kg e metformina 50 mg/kg (HPM), incorporados em iogurte. Foram monitorados: (i) parâmetros fisiológicos: peso corporal, massa de tecidos adiposos e órgãos, ingestão alimentar e consumo energético; (ii) parâmetros bioquímicos: glicemia, teste de tolerância a glicose oral (TTGO), teste de tolerância à insulina (ITT), triacilgliceróis, colesterol total, HDL-colesterol, fosfatase alcalina (ALP), aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), ureia e ácido úrico; (iii) biomarcadores de estresse glico-oxidativo e enzimas antioxidantes no plasma, fígado e rim: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), produtos finais de glicação avançada (AGE), paraoxonase 1 (PON-1), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). Os animais que consumiram dieta hiperlipídica apresentaram piora nos parâmetros analisados em comparação com os animais dos grupos padrão e demais grupos HP, HM e HPM, indicando a instalação do modelo de obesidade e resistência insulínica, acompanhado de estresse oxidativo. Os grupos HP, HM e HPM demonstraram menor ganho de peso corporal, deposição de tecidos adiposos reduzida, níveis glicêmicos mais baixos e redução da dislipidemia, destacando o papel importante na redução da adiposidade, controle da glicemia e sensibilidade à insulina. Além disso, apresentaram valores menores de TBARS e AGE no plasma, fígado e rim, indicando menor dano oxidativo nos tecidos, além de aumento nas atividades da PON-1, SOD,

CAT e GPx. A integração desses resultados nos permite concluir que os efeitos isolados ou combinados do tratamento com própolis vermelha incorporado em iogurte são promissores para o tratamento de DM tipo 2, justificando a necessidade de avançar em estudos com compostos bioativos naturais.

Palavras-chave: diabetes mellitus; dieta ocidental; estresse glico-oxidativo; produtos apícolas; terapia combinada.

Abstract

Obesity plays a key role in the development of diabetes mellitus (DM) and its complications, such as hyperglycemia, driven by lifestyle changes and high-fat diets. These factors contribute to glyco-oxidative stress, leading to biomolecular damage, insulin resistance, and low-grade inflammation. Metformin is the standard treatment for type 2 DM, but there is growing interest in combining it with natural bioactive compounds that counteract the harmful effects of glyco-oxidative stress. In this study, we investigated the effects of a hydroethanolic extract of Brazilian red propolis (PVB), incorporated into yogurt, administered alone or in combination with metformin, in a model of obesity and insulin resistance induced by a high-fat diet (35% lipids). Male mice (C57BL/6j) were divided into seven groups: standard diet, treated with water (P) or PVB 100 mg/kg (PP); high-fat diet, treated with water (HL), yogurt (HI), PVB 100 mg/kg (HP), metformin 50 mg/kg (HM), and a combination of PVB 100 mg/kg and metformin 50 mg/kg (HPM), incorporated into yogurt. We monitored the following: (i) physiological parameters — body weight, adipose tissue and organ mass, food intake, and energy consumption; (ii) biochemical parameters — blood glucose, oral glucose tolerance test (OGTT), insulin tolerance test (ITT), triacylglycerols, total cholesterol, HDL-cholesterol, alkaline phosphatase (ALP), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), urea, and uric acid; and (iii) biomarkers of glyco-oxidative stress and antioxidant enzymes in plasma, liver, and kidney, including thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), advanced glycation end products (AGE), paraoxonase 1 (PON-1), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GPx). Animals on the high-fat diet exhibited worsened parameters compared to those in the standard diet groups and other intervention groups (HP, HM, and HPM), confirming the establishment of the obesity and insulin resistance model with concurrent oxidative stress. The HP, HM, and HPM groups showed lower body weight gain, reduced adipose tissue deposition, improved glycemic levels, and reduced dyslipidemia, underscoring the significant roles of these treatments in reducing adiposity, glycemic control, and insulin sensitivity. Moreover, these groups had lower TBARS and AGE values in plasma, liver, and kidney, suggesting reduced oxidative tissue damage, as well as increased activities of PON-1, SOD, CAT, and GPx. These findings support the potential of treatments with red propolis, incorporated into yogurt, for type 2 DM

management and highlight the need for further studies on natural bioactive compounds.

Keywords: diabetes mellitus; Western diet; glyco-oxidative stress; bee products; combined therapy.

Lista de Figuras

Figura 1 - Formação de produtos finais de glicação avançada in vivo. Existem três vias endógenas diferentes: a reação não enzimática de Maillard, a via do poliol e a peroxidação lipídica.....	5
Figura 2 - Estresse oxidativo e sistema de defesa antioxidante. UCP2, proteína desacopladora 2; I, II, III, IV, V, complexos multienzimáticos do sistema de fosforilação oxidativa na mitocôndria.	8
Figura 3 - Os mecanismos de ação da própolis na melhora da síndrome metabólica (SM).	14
Figura 4 - Obtenção do extrato hidroetanólico de própolis vermelha brasileira.	21
Figura 5 - Delineamento experimental de camundongos submetidos ao modelo de obesidade/resistência insulínica por 16 semanas, tratados com própolis e metformina isolados ou em combinação, incorporados ao iogurte. Dieta P: padrão; Dieta H: hiperlipídica; P: grupo tratado com água; PP: grupo tratado com PVB; HL: grupo tratado com água; HI: grupo tratado com iogurte; HP: grupo tratado com PVB; HM: grupo tratado com metformina; HPM: grupo tratado com própolis + metformina; TTGO: teste de tolerância a glicose oral; ITT: teste de tolerância a insulina.	25
Figura 6 - Representação entre as razões das velocidades de <i>bleaching</i> e das concentrações de vitamina E, no ensaio do clareamento do β -caroteno na presença do extrato etanólico de própolis vermelha brasileira (EEPV), em Tween 40. Queda de absorbância do β -caroteno, a 470 nm, na ausência (v_0) e presença (v) de EEPV ($\mu\text{g/mL}$), em função do tempo (10 minutos). v_0 , velocidade na ausência de EEPV; v , velocidade na presença de EEPV; $[B]$, concentração de β -caroteno constante (10 $\mu\text{mol/L}$) e $[A]$, concentração de EEPV.	32
Figura 7 - (A) Evolução do peso corporal e (B) ganho de peso corporal total de camundongos alimentados com as dietas padrão ou hiperlipídica e tratados com própolis vermelha, metformina ou combinados, em iogurte, durante 8 semanas.	34
Figura 8 - (A) Ingestão alimentar (g/dia) e (B) ingestão energética (Kcal/dia) de camundongos alimentados com as dietas padrão ou hiperlipídica e tratados com própolis vermelha, metformina ou combinados, em iogurte, durante 8 semanas.	36
Figura 9 - Acompanhamento da glicemia (mg/dL) de camundongos, durante: (A) teste de tolerância à glicose oral em 0, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos e (B) sua AUC; e o (C) teste de tolerância à insulina em 0, 15, 30, 45 e 60 minutos e (D) sua AUC.	41

Figura 10 - Níveis plasmáticos de (A) TBARS ($\mu\text{mol/L}$), (B) AGE fluorescentes (U.A./mg proteína) e (C) atividade de PON-1 (U/mg HDL-colesterol).	45
Figura 11 - Níveis hepáticos de (A) TBARS ($\mu\text{mol/g}$ de tecido) e (B) AGE fluorescentes (U.A./mg proteína).....	46
Figura 12 - Atividade das enzimas antioxidantes hepáticas (A) superóxido dismutase (SOD); (B) catalase (CAT); (C) glutatona peroxidase (GPx).	48
Figura 13 - Níveis renais de (A) TBARS ($\mu\text{mol/g}$ de tecido) e (B) AGE fluorescentes (U.A./mg proteína).....	50
Figura 14 - Atividade das enzimas antioxidantes renais (A) superóxido dismutase (SOD); (B) catalase (CAT); (C) glutatona peroxidase (GPx).	51

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Composição das dietas padrão (P) e hiperlipídica (H)	23
Tabela 2 - Valores de coeficiente angular e EC50 da PVB para o ensaio de clareamento do β -caroteno.	33
Tabela 3 - Massas tecidos adiposos brancos (epididimal e retroperitoneal), tecido adiposo marrom interescapular, fígado, rins, coração e músculos <i>gastrocnemius</i> (mg / mm de tíbia)	38
Tabela 4 - Níveis dos parâmetros bioquímicos plasmáticos de camundongos alimentados com dieta P ou H e tratados por 8 semanas com PV isoladamente ou em combinação com metformina.	43
Tabela Suplementar 5 - Identificação de compostos fenólicos do extrato de PVB por LC-ESI-QTOF-MS/MS (adaptado de Vieira de Moraes, 2021).....	85

Lista de Abreviaturas e Siglas

AGE	advanced glycation end products, produtos finais de glicação avançada
AGE-R	AGE receptor complex
AKT	proteína quinase B
ALP	fosfatase alcalina
ALT	alanina aminotransferase
AMPK	proteína quinase AMP-ativada
ANOVA	análise de variância One-way
AST	aspartato aminotransferase
CAT	catalase
DM	Diabetes mellitus
ERN	espécies reativas de nitrogênio
ERO	espécies reativas de oxigênio
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
GR	glutathione reductase
GSH	glutathione reduced
GSSH	glutathione oxidized
GPx	glutathione peroxidase
HDL-colesterol	lipoproteína de alta densidade
HERP	extrato hidro-etanólico de PVB
HI	grupo de animais alimentados com dieta hiperlipídica e tratados com iogurte
HL	grupo de animais alimentados com dieta hiperlipídica e tratados com água
HP	grupo de animais alimentados com dieta hiperlipídica e tratados com própolis vermelha em iogurte
HPM	grupo de animais alimentados com dieta hiperlipídica e tratados com própolis vermelha, metformina em iogurte
HM	grupo de animais alimentados com dieta hiperlipídica e tratados com metformina em iogurte

ITT	teste de tolerância a insulina
LC-ESI-QTOF-MS/MS	espectrometria de massa de
alta resolução	
LDL-colesterol	lipoproteína de baixa densidade
LDL-ox	lipoproteína de baixa densidade
oxidada	
MDA	malondialdeído
NAFLD	doença hepática gordurosa não
alcoólica	
NASH	nonalcoholic steatohepatitis
NBT	nitroblue tetrazolium
NF-κB	fator de transcrição nuclear-κB
Nrf2	fator nuclear eritroide 2
relacionado ao fator 2	
OMS	Organização Mundial da Saúde
P	grupo de animais alimentados
com dieta padrão e tratados com água	
PP	grupo de animais alimentados
com dieta padrão e tratados com própolis vermelha em iogurte	
PON 1	paraoxonase 1
PVB	própolis vermelha brasileira
RAGE	receptores de AGE
SOD	superóxido dismutase
TAB	tecido adiposo branco
TAM	tecido adiposo marrom
TBA	ácido tiobarbitúrico
TBARS thiobarbituric acid reactive substances	substâncias reativas ao ácido
tiobarbitúrico	
TTGO	teste de tolerância a glicose
oral	
WHO	<i>World Health Organization</i>

Sumário

1.	Introdução	1
2.	Referencial bibliográfico.....	2
2.1.	Obesidade e Diabetes Mellitus tipo II	2
2.2.	Sistemas de detoxificação de AGE e antioxidantes	6
2.3.	Tratamento do DM tipo 2	9
2.4.	Própolis.....	12
2.5.	Composição da própolis.....	14
2.6.	Própolis Vermelha Brasileira	15
3.	Objetivos.....	19
4.	Material e Métodos	20
4.1.	Amostra de própolis vermelha brasileira (PVB)	20
4.1.1.	Obtenção do extrato hidroetanólico de PVB.....	20
4.1.2.	Caracterização dos compostos fenólicos por espectrometria de massa de alta resolução (LC-ESI-QTOF-MS/MS)	21
4.1.3.	Determinação da atividade antioxidante da Própolis Vermelha, utilizando o sistema-modelo em meio micelar com β -caroteno/AAPH (2,2'-Azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride).....	21
4.2.	Animais, dietas e tratamentos	22
4.3.	Delineamento experimental e obtenção de amostras biológicas	24
4.4.	Homeostase da glicose.....	25
4.5.	Eutanásia e processamento de material biológico	26
4.6.	Determinações analíticas	26
4.6.1.	Biomarcadores do metabolismo de carboidratos, lipídios e das disfunções hepática e renal	26
4.6.2.	Biomarcadores de peroxidação lipídica: determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (<i>thiobarbituric acid reactive substances</i>)	28
4.6.3.	Biomarcadores de glicação avançada: estimativa dos produtos finais de glicação avançada (AGE) no plasma, fígado e rins	29
4.6.4.	Biomarcadores relacionados à atividade antioxidante	30
4.6.5.	Dosagem de proteínas totais em sobrenadantes de fígado e rins	31
4.7.	Análise estatística.....	31
5.	Resultados	32
5.1.	Determinação da capacidade antioxidante da Própolis Vermelha no ensaio do <i>bleaching</i> do β -caroteno/AAPH em meio micelar (Tween 40).....	32
5.2.	Parâmetros fisiológicos de camundongos em modelo de obesidade e resistência à insulina	33

5.2.1.	Evolução do peso corporal.....	33
5.2.2.	Ingestão alimentar e energética	35
5.2.3.	Massas de tecidos adiposo, fígado, rim, coração e músculos <i>gastrocnemius</i>	37
5.3.	Parâmetros bioquímicos de camundongos em modelo de obesidade e resistência à insulina 38	
5.3.1.	Testes de tolerância à glicose oral (TTGO) e de sensibilidade à insulina (ITT)	38
5.3.2.	Níveis plasmáticos de biomarcadores do metabolismo de carboidratos, lipídios e das disfunções hepática e renal	41
5.4.	Biomarcadores relacionados ao estresse glico-oxidativo e potencial antioxidante	44
5.4.1.	Níveis plasmáticos	44
5.4.2.	Tecido hepático.....	45
5.4.3.	Tecido renal	49
6.	Discussão	52
7.	Conclusão	65
	Referências.....	66
	APÊNDICE A – Composição química do Extrato de PVB.....	85
	APÊNDICE B – Curvas de Calibração.....	87
	ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética no Uso de Animais	88
	ANEXO B -Registro na plataforma <i>SisGen</i>	89

1. Introdução

A obesidade e o diabetes mellitus tipo II (DM tipo 2) constituem desafios significativos para a saúde pública global. A crescente prevalência da obesidade e a sua associação com o DM tipo 2 têm implicações profundas para a qualidade de vida das populações e os custos dos sistemas de saúde. A Organização Mundial da Saúde (OMS – WHO, *World Health Organization*) estima que cerca de um em cada dez adultos em todo o mundo seja obeso, tornando a obesidade uma epidemia de alcance planetário.

O DM tipo 2, por sua vez, é uma condição metabólica crônica caracterizada pela resistência à insulina e subsequente disfunção de sua secreção pelo pâncreas, levando a níveis elevados de glicose no sangue (hiperglicemia). A obesidade em especial a adiposidade intra-abdominal, desempenha um papel crucial no desenvolvimento do DM tipo 2, contribuindo para uma série de efeitos prejudiciais, incluindo aumento dos níveis de ácidos graxos não esterificados no sangue, armazenamento de gordura ectópica em órgãos e a secreção de adipocinas que afetam a ação e a secreção de insulina.

Este cenário é agravado pelo fato de que a obesidade também aumenta o risco de outras condições adversas de saúde, como doenças cardiovasculares, distúrbios musculoesqueléticos e câncer (WHO, 2020). Portanto, é imperativo abordar de maneira abrangente os fatores subjacentes à obesidade e ao DM tipo 2 para mitigar os impactos negativos dessas condições na saúde pública.

A presente pesquisa concentra-se na investigação por estratégias terapêuticas que possam substituir ou melhorar a eficácia da metformina, um medicamento amplamente utilizado no tratamento do DM tipo 2, ao mesmo tempo em que minimiza os efeitos deletérios do estresse glico-oxidativo associado a essa condição. A metformina é conhecida por seus benefícios na redução da glicemia e na aumento da sensibilidade à insulina (Rena; Hardie; Pearson, 2017). No entanto, seu uso pode estar associado a efeitos colaterais gastrointestinais (Flory et al., 2019) e variações em sua eficácia em diferentes pacientes (Zhou et al., 2016).

Diante disso, tem sido proposta a combinação da metformina com compostos bioativos naturais, como em particular a própolis. A própolis é um produto resinoso coletado por abelhas de várias fontes vegetais, com propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antiglicação bem estabelecidas (Prabhakar; Kumar; Doble, 2014; Salehi et al., 2019). Além disso, evidências sugerem que a própolis pode exercer um impacto

positivo na regulação do metabolismo de glicose e lipídios, oferecendo um potencial terapêutico no gerenciamento do DM tipo 2 e de suas complicações (Afsharpour et al., 2019; Hesami et al., 2019; Kitamura, 2019).

No contexto desta pesquisa, também é importante destacar que diferentes variedades de própolis, como a própolis vermelha brasileira (PVB), apresentam composições químicas únicas e potencialmente benéficas para a saúde (Silva et al., 2008). Essa diversidade da natureza química da própolis proporciona a oportunidade para a otimização da terapia combinada com a metformina. Além disso, estudos clínicos sugerem que a PVB pode melhorar o status glicêmico e antioxidante, reduzir a resistência insulínica e atuar como adjuvante no tratamento de pacientes com DM tipo 2 (Afsharpour et al., 2019; Hesami et al., 2019; Mujica et al., 2017; Samadi et al., 2017).

Além disso, considerando a tendência dos consumidores por alimentos naturais e saudáveis, a investigação sobre a utilização da PVB como aditivo de alimentos funcionais, como o iogurte, pode abrir portas para o desenvolvimento de produtos nutracêuticos no mercado alimentício (Santos et al., 2019).

Diante da crescente prevalência da obesidade e do DM tipo 2, bem como da necessidade de estratégias terapêuticas mais eficazes e personalizadas, esta pesquisa assume uma realização qualificada na investigação por soluções que possam melhorar a qualidade de vida dos pacientes e reduzir a carga global dessas patologias na saúde pública.

2. Referencial bibliográfico

2.1. Obesidade e Diabetes Mellitus tipo II

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2020) cerca de um em cada dez adultos são obesos, condicionando a obesidade como uma epidemia em

diversas regiões do mundo. Dados de 2016 estimaram que, entre adultos, 1,9 bilhão tinham sobrepeso (mais de 650 milhões eram obesos), e entre crianças e adolescentes, 124 milhões encontravam-se neste contexto.

Diversos fatores justificam o aumento na prevalência da obesidade. Embora existam fatores genéticos associados, estes são mais relevantes quando ligados com mudanças no estilo de vida que favorecem o aumento de peso corporal (González-Muniesa et al., 2017). Assim, são fatores importantes a serem considerados: (i) o aumento da ingestão calórica, com aumento no consumo de carboidratos e gorduras saturadas, (ii) e a diminuição no gasto energético, já que a sociedade moderna tem adquirido hábitos cada vez mais sedentários (González-Muniesa et al., 2017).

A prevalência global da obesidade promove aumento na incidência de várias doenças metabólicas, tais como doenças cardiovasculares, distúrbios músculo-esqueléticos, diferentes tipos de câncer, além de adiposidade e diabetes mellitus tipo 2 (DM tipo 2) (WHO, 2020). O DM tipo 2, por sua vez, é caracterizado pela combinação entre resistência à insulina nos tecidos alvo e secreção insuficiente de insulina (disfunção pancreática), culminando em hiperglicemia (Scheen, 2003).

A obesidade, especialmente a adiposidade intra-abdominal, tem consequências pivotais no desenvolvimento de DM tipo 2, através de numerosos mecanismos, incluindo níveis circulantes elevados de ácidos graxos não-esterificados, armazenamento de gordura ectópica exercendo um efeito tóxico no fígado, músculo e pâncreas, e estimula a secreção de adipocinas que podem interferir na ação e secreção da insulina (Scheen, 2003).

No fígado, níveis elevados de carboidratos, ocasiona a lipogênese *de novo*, processo envolvido na síntese de ácidos graxos a partir de subunidades de acetil-CoA, no qual, este processo pode ser aumentado em casos de hiperinsulinemia (Sanders; Griffin, 2016). Contudo, o acúmulo de triglicerídeos no fígado também pode ser resultado da ação de intermediários tóxicos gerados pelo metabolismo de lipídeos, tal como o diacilglicerol (DAG), que é um mediador chave da resistência à insulina induzida por lipídios, via ativação da proteína quinase C ϵ (PKC ϵ) que fosforila e inibe o receptor de insulina (Gassaway et al., 2018).

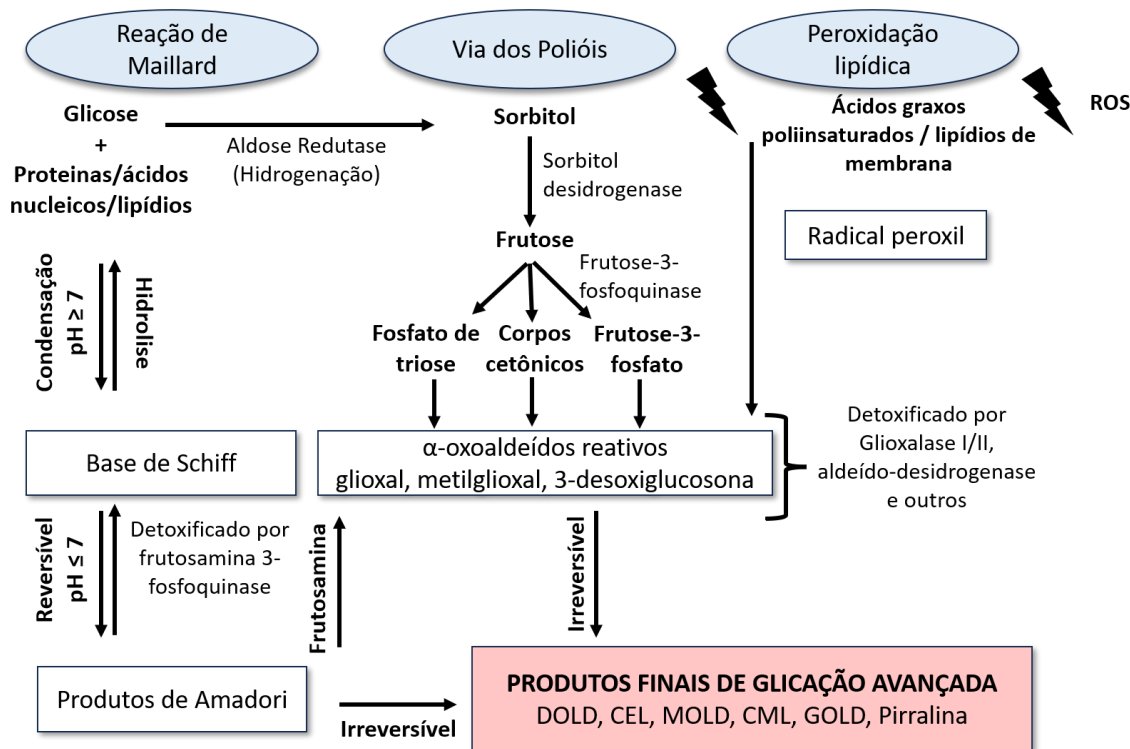
A hiperglicemia também tem relevância eminente no desenvolvimento de alterações patológicas no rim, ocasionada pela resistência insulínica no DM tipo 2

(Akhtar et al., 2019). Os rins são extremamente dependentes da atividade mitocondrial e devido à alta demanda energética, há alterações na filtração do sangue, reabsorção de nutrientes, no balanço de eletrólitos e fluidos, e na manutenção da homeostase ácido-base e da pressão arterial (Bhargava; Schnellmann, 2017). Durante a prevalência hiperglicêmica, o acúmulo de glicose e ácidos graxos, resulta em desbalanço de espécies reativas, em especial, de oxigênio (ERO), geradas via oxidação dessas biomoléculas, e das defesas antioxidantes na mitocôndria, causando queda na produção de trifosfato de adenosina (ATP, *adenosine triphosphate*) e aumento de apoptose celular (Bhargava; Schnellmann, 2017).

A hiperglicemia prolongada associada as condições de estresse glico-oxidativo, causa glicação de proteínas e amino lipídios por reações independentes de enzimas, levando à geração de produtos finais de glicação avançada (AGE, *advanced glycation end product*) (Volpe et al., 2018). A produção de AGE ocorre principalmente com o processo de glicação de proteínas, via reação de Maillard, resultando em reações de condensação entre o grupo carbonila de um açúcar redutor com grupos amino livres, gerando bases de Schiff, que se rearranjam em produtos estáveis e reversíveis (produtos de Amadori) (Bierhaus et al., 1998).

Os produtos de Amadori, por sua vez, podem reagir irreversivelmente com peptídeos ou proteínas para formar ligações cruzadas de proteínas, gerando α -dicarbonilas dos quais são bem conhecidos: glioxal, metilglioxal e 3-deoxiglicosona (Chaudhuri et al., 2018). O acúmulo anormal destes metabólitos dicarbonílicos e suas consequências estruturais e funcionais são conhecidos como estresse dicarbonílico (Rabbani; Xue; Thornalley, 2019), sendo altamente reativos, participando de reações de oxidação, desidratação ou polimerização para originar numerosos outros AGE, e com frequência são considerados propagadores das lesões glico-oxidativas (Chaudhuri et al., 2018). *In vivo*, as α -dicarbonilas podem reagir com resíduos de aminoácidos em proteínas, levando à formação de diversos outros AGE, sendo os mais conhecidos N-(carboximetil) lisina (CML), N-(carboxietil) lisina (CEL), dímero de lisina derivado de glioxal (GOLD) e de metilglioxal (MOLD), N-(5-metil-4-imidazolona-2-il)-ornitina (MG-H1), arg-pirimidina, pirralina, pentosidina e vesperlisinas (Figura 1) (Nowotny et al., 2015; Vistoli et al., 2013).

Figura 1 - Formação de produtos finais de glicação avançada in vivo. Existem três vias endógenas diferentes: a reação não enzimática de Maillard, a via do poliol e a peroxidação lipídica.



Fonte: adaptado de OTT *et. al.*, 2014.

Compostos dicarbonílicos também se originam a partir do processo de auto-oxidação de monossacarídeos, tais como glicose, frutose, ribose e gliceraldeído (via de Wolff). Além disso, produtos resultantes da oxidação e degradação de aminoácidos e lipídeos também contribuem para a formação de compostos carbonílicos. No caso específico da peroxidação lipídica, ocorre quando ERO atacam ácidos graxos poli-insaturados nas membranas biológicas. Esse fenômeno é considerado uma das principais fontes de compostos carbonílicos, especialmente α-oxoaldeídos, conhecidos como espécies reativas carbonílicas (ERC). Dentre os produtos finais tóxicos gerados, destacam-se o malondialdeído (MDA), 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) e α-oxoaldeídos como glicoxal e metilglicoxal (Ott et al., 2014; Vistoli et al., 2013).

A formação destes produtos finais em lipídeos e peptídeos/proteínas é um componente inevitável do processo de envelhecimento em todos os organismos eucarióticos, incluindo humanos (Chaudhuri et al., 2018) e acredita-se que o acúmulo destes produtos contribui, ao menos parcialmente, para as condições de estresse crônico no diabetes (Nowotny et al., 2015). Os principais mecanismos envolvidos em seus efeitos deletérios são: (i) formação de *crosslinking* em macromoléculas, (ii) e

sua interação com receptores encontrados em membranas plasmáticas celulares (Nugent; He, 2018a).

O *crosslinking* é a formação de ligações cruzadas entre proteínas (Nemet; Strauch; Monnier, 2011), resultando em modificações estruturais e consequentemente em sua funcionalidade, contribuindo para a perda de função de biomoléculas intra- e extracelulares (componentes da matriz) e precede o estabelecimento das complicações diabéticas (Abbas et al., 2016).

A ligação destes produtos finais em receptores específicos presentes nas membranas celulares resulta na ativação de diversas vias de sinalização, que podem promover o estresse oxidativo por acentuar a produção de ERO e espécies reativas de nitrogênio (ERN), assim como desenvolver um perfil pró-inflamatório e pró-apoptótico, sendo os mais investigados, os receptores de AGE (RAGE) (Ott et al., 2014; Yamagishi; Matsui, 2010). No fígado, os RAGE são amplamente distribuídos e em doenças hepáticas graves, níveis elevados de RAGE podem contribuir para o processo de fibrose (Hyogo; Yamagishi, 2008).

2.2. Sistemas de detoxificação de AGE e antioxidantes

No fígado ocorre uma etapa importante no catabolismo e eliminação de AGE, através de receptores *scavenger* presentes nas células de Kupffer e células endoteliais sinusoidais (Basta et al., 2011). Aos rins também se atribui uma via fundamental na eliminação de AGE do organismo, filtrando e excretando aminoácidos modificados por AGE (adutos livres da glicação) (Rabbani; Xue; Thornalley, 2019).

No entanto, quando há um excedente dos produtos finais de glicação, a função *scavenger* das células endoteliais sinusoidais pode estar prejudicada, resultando em prejuízos no transporte intracelular de proteínas senescentes e dos AGE, decorrentes do seu acúmulo (Basta et al., 2011; Hyogo; Yamagishi, 2008); o mesmo acontece com os rins, quando a função renal está prejudicada, o acúmulo de adutos contribui para a disfunção renal e estabelecimento de doença renal crônica (Rabbani; Xue; Thornalley, 2019).

Os AGE-receptor complex (AGE-R), são uma outra família de receptores que se ligam aos AGE, no entanto, diferentemente dos RAGE, os AGE-R participam do sistema de detoxificação dos produtos finais de glicação, diminuindo os danos

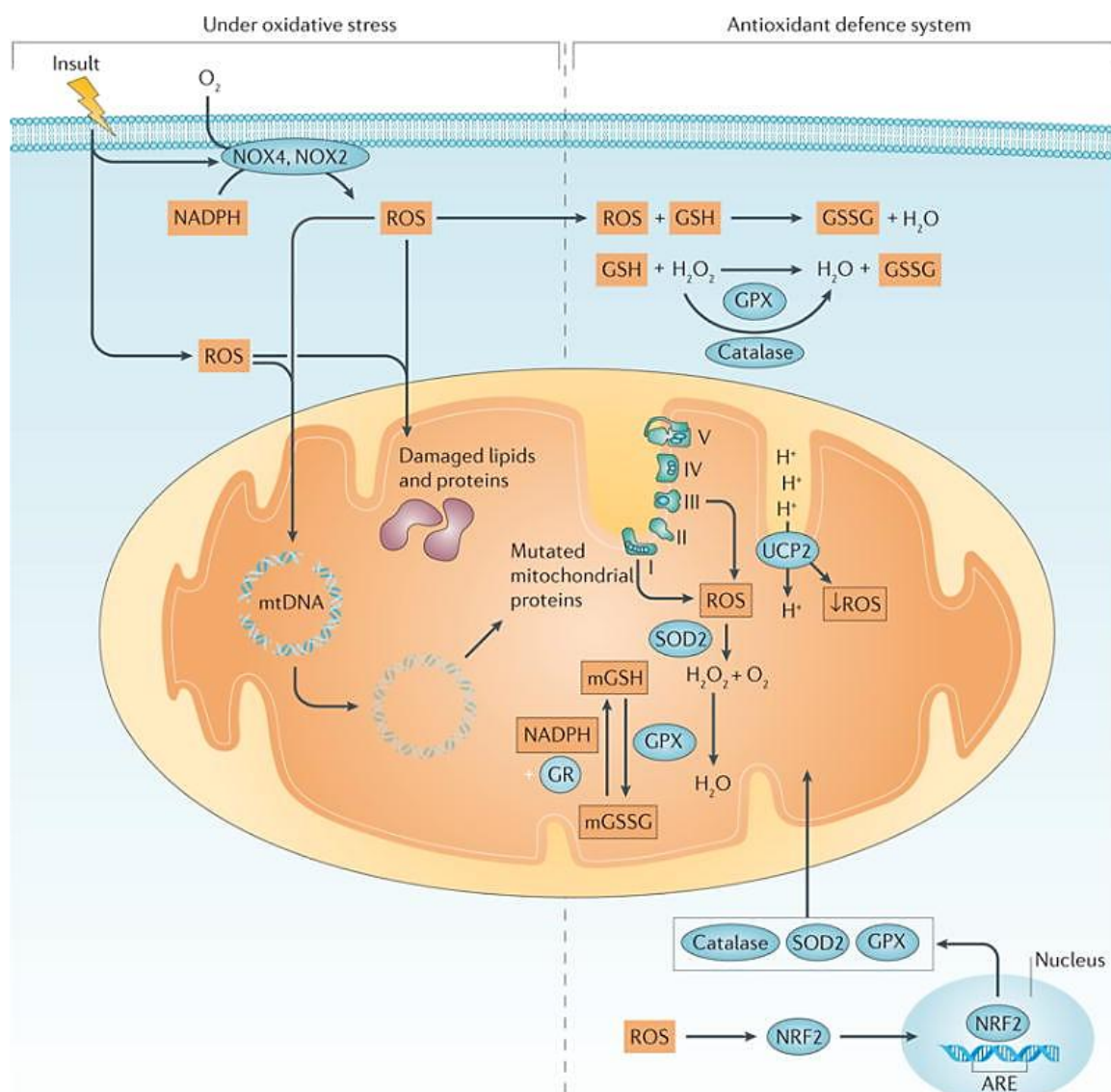
causados por eles (Ott et al., 2014). O complexo AGE-R consiste de AGE-R1 (OST-48), AGE-R2 (80K-H) e AGE-R3 (galectina-3), com destaque ao AGE-R1, que se ativa ao ligar-se às proteínas modificadas por AGE e as internaliza, para que sejam degradadas. E o aumento da sua expressão está relacionado a diminuição na ativação de RAGE, assim, diminuindo o estresse oxidativo proveniente da interação AGE-RAGE (Ott et al., 2014).

O sistema da glioxalase é outro processo envolvido na detoxificação de AGEs, composto pelas enzimas glioxalase 1 (GLO 1), glioxalase 2 (GLO 2) e pelo metabólito glutathiona reduzida (GSH), amplamente distribuídos em quase todos os tipos celulares, eliminando os efeitos deletérios do estresse dicarbonílico, tendo como principal substrato o metilglioxal (Rabbani; Xue; Thornalley, 2019).

O aumento na produção mitocondrial de ERO é outro mecanismo chave para o estabelecimento do estresse oxidativo, no qual, há uma alta taxa de oxidação de glicose e ácidos graxos, aumento do fluxo de substratos que participam da cadeia transportadora de elétrons (NADH e FADH₂) e extravasamento de elétrons, resultando na formação do ânion radical superóxido e outras espécies reativas (Nishikawa et al., 2007).

Os sistemas antioxidantes, como as defesas enzimáticas contra os efeitos deletérios de ERO e ERN, representadas por superóxido dismutase (SOD) que catalisa a dismutação do O₂^{•-} em H₂O₂ e O₂; catalase (CAT), atua na decomposição de H₂O₂ em O₂ e H₂O e glutathiona peroxidase (GPx), atua sobre H₂O₂ e peróxidos orgânicos, utilizando o potencial redutor do tripeptídeo GSH (Gutteridge; Halliwell, 2010). O Nrf2 (fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2) também possui efeito regulatório sobre o estresse oxidativo, estimulando a expressão destas enzimas (Xu et al., 2019), diminuindo a atividade do fator de transcrição nuclear-κB (NF-κB) (Pall; Levine, 2015) e outros mediadores inflamatórios, como a interleucina (IL)-1β e o fator de necrose tumoral-α (TNF-α) (Ho; Bray, 1999), exemplificado na Figura 2.

Figura 2 - Estresse oxidativo e sistema de defesa antioxidante. UCP2, proteína desacopladora 2; I, II, III, IV, V, complexos multienzimáticos do sistema de fosforilação oxidativa na mitocôndria.



Fonte: BHARGAVA; SCHNELLMANN, 2017.

Em condições normais, o Nrf2 tem sua atividade inibida por Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1); quando há estresse oxidativo na célula, o Nrf2 se dissocia de Keap 1 e inicia sua atividade transcrricional (Xu et al., 2019). No entanto, quando a produção de ERO ultrapassa a capacidade das defesas antioxidantes, observam-se danos funcionais em biomoléculas (DNA, lipídeos e proteínas), em diversos tecidos, em especial os insulino-independentes para captação de glicose (rins, retina, endotélio vascular, pâncreas e fígado) (Tabit et al., 2010).

Além disso, o Nrf2 é sujeito a regulação por meio de diversas quinases, tais como as quinases ativadas por mitógenos (MAPK), a proteína quinase C (PKC) e a

fosfoinosítídeo-3-quinase (PI3K) (Shi et al., 2018; Wong et al., 2016; Xiao et al., 2018). É notável que uma variedade de compostos, sejam eles de origem natural ou sintética, apresentam a capacidade de ativar a via de sinalização do Nrf2 (Huang et al., 2015; Jadeja et al., 2016). A ativação do Nrf2 por meio de indutores específicos tem demonstrado a habilidade de mitigar a citotoxicidade provocada pelo estresse oxidativo *in vitro*, em diversas linhagens celulares (Park et al., 2018; Paudel; Jung; Choi, 2018). Adicionalmente, experimentos conduzidos em animais e ensaios clínicos em seres humanos têm corroborado a capacidade dos indutores do Nrf2 em reduzir o estresse oxidativo e conferir efeitos terapêuticos benéficos (Seyyedebrahimi et al., 2018; Sharma et al., 2018).

O alto índice de doenças cardiovasculares associados a indivíduos com DM tipo 2 tem relação com o aumento na formação de lipoproteína de baixa densidade-oxidada (LDL-ox), considerada determinante-chave da patogênese da aterosclerose (Rudel et al., 1986), incluindo disfunção endotelial via aumento na produção de $O_2^{\cdot-}$ e remodelamento da musculatura vascular lisa (Galle et al., 2006). A enzima antioxidante paraoxonase 1 (PON 1), realiza a hidrólise de peróxidos lipídicos em lipoproteínas (HDL e LDL), sendo capaz de atenuar a oxidação de LDL e consequentemente reduzir o acúmulo de LDL-ox (Meneses et al., 2019).

Após o diagnóstico de diabetes ou de pré-diabetes, um precoce e intensivo controle da glicemia deve ser estabelecido, com objetivo de alcançar os níveis de normalidade da glicemia e do controle metabólico, reduzindo os riscos das complicações micro- e macro vasculares da doença (Testa et al., 2017). No entanto, adicionalmente ao controle glicêmico, a introdução de agentes terapêuticos capazes de diminuir os impactos deletérios de ERO e AGE mostrou-se eficaz em minimizar as complicações em longo prazo que podem ocorrer em indivíduos diabéticos (Testa et al., 2017).

2.3. Tratamento do DM tipo 2

A metformina (dimetilbiguanida) é o agente antidiabético oral de primeira escolha para o tratamento do DM tipo 2 (Rena; Hardie; Pearson, 2017), sendo o único representante da classe das biguanidas ainda no mercado (Bailey; Turner, 1996). As biguanidas são formadas pela ligação de dois anéis guanidinas onde a molécula de metformina é a menos lipofílica dentre elas, o que a tornou mais segura para o uso

clínico, com biodisponibilidade oral de 50 a 60%, fraca ligação às proteínas no plasma e tem alto volume de distribuição, com acumulação máxima no intestino delgado e rins (Bailey; Turner, 1996).

A metformina promove diminuição do acúmulo de lipídeos no fígado (aumentando a sensibilidade à insulina) e também diminuição da glicemia via inibição de enzimas chave da gliconeogênese (Rena; Hardie; Pearson, 2017). Este medicamento também é capaz de restaurar a função endotelial, via inibição do estresse do retículo endoplasmático, o estresse oxidativo (Cheang et al., 2014) e modificações oxidativas em lipoproteínas associadas à glicação (especialmente LDL e HDL) (Kheniser; Kashyap; Kasumov, 2019).

O processo de supressão da gliconeogênese ocorre através da inibição de uma isoforma mitocondrial específica da glicerofosfato desidrogenase (mGPD), enzima responsável por converter o glicerofosfato em fosfato de di-hidroxiacetona, evitando com que o glicerol participe da via gliconeogênica (Madiraju et al., 2014). A inibição da mGPD também leva à acumulação de NADH citoplasmático e à diminuição da conversão de lactato em piruvato, limitando a contribuição do lactato na gliconeogênese hepática (Madiraju et al., 2014).

A redução dos níveis séricos de lipídios pela metformina ocorre através da ativação da enzima proteína quinase AMP-ativada (AMPK) nos hepatócitos (Zhou et al., 2001), no qual a fosforilação inibitória dependente de AMPK das acetil-CoA carboxilases, Acc1 e Acc2, suprimem a lipogênese e diminuem a síntese celular de ácidos graxos no fígado e nos músculos (Fullerton et al., 2013).

Os benefícios da metformina têm sido observados em indivíduos obesos e em animais sob modelo de obesidade (dieta hiperlipídica) que apresentam complicações hepáticas, especialmente doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD) e NASH (nonalcoholic steatohepatitis) (Brandt et al., 2019; Mazza et al., 2012).

Contudo, são observadas limitações quanto ao uso deste fármaco, devido as variações nas respostas individuais à terapia antihiperglicêmica (Zhou et al., 2016). Adicionalmente, distúrbios gastrointestinais, tais como diarreia, dispepsia, náuseas e vômitos, são observados em 20% dos pacientes que fazem uso contínuo da metformina, sendo tais efeitos adversos uma das principais causas de descontinuidade de seu uso (Flory et al., 2019). E de forma crônica, devido sua

excreção ocorrer via renal, pode levar ao acúmulo e risco de acidose láctica (no sangue) na presença de insuficiência renal (Bailey; Turner, 1996).

Além das biguanidas, destacam-se outras classes de agentes anti-hiperglicemiantes orais, como as sulfonilureias e as glinidas. Estas classes constituem opções terapêuticas alternativas à metformina em situações de contraindicação de biguanidas. Adicionalmente, são frequentemente empregadas em terapias combinadas para o tratamento do diabetes mellitus (DM) (Marín-Peñalver et al., 2016). Apesar de apresentarem diferenças em suas ações farmacológicas, o mecanismo de ação dessas classes baseia-se na estimulação da secreção de insulina pelas células β pancreáticas, por meio do fechamento dos canais de potássio sensíveis ao ATP, promovendo a despolarização da membrana plasmática das células β , resultando no aumento dos níveis de cálcio intracelular e subsequente liberação de insulina. As glinidas, em comparação com as sulfonilureias, induzem uma secreção de insulina mais rápida, porém possuem uma meia-vida mais curta, sendo necessário maior frequência de administrações para manter a concentração plasmática dentro da faixa terapêutica (Marín-Peñalver et al., 2016).

Existem também os antidiabéticos da classe das glitazonas (ou TZD). Esta classe de medicamentos age ativando os receptores PPARs (receptores ativados por proliferadores de peroxissoma), o que aumenta a expressão de genes envolvidos no metabolismo de lipídios, carboidratos e na diferenciação celular. Além disso, podem inibir diretamente a transcrição gênica, exercendo efeitos anti-inflamatórios ao inibir o fator de transcrição NF- κ B. Como resultado, as TZDs aumentam a sensibilidade à insulina nos músculos, tecidos adiposos e fígado, aumentando o uso da glicose disponível e reduzindo a gliconeogênese (Marín-Peñalver et al., 2016). No entanto, esta classe de medicamentos geralmente não é a primeira escolha para o tratamento do DM, devido aos seus efeitos adversos, como ganho de peso (causado pela ativação do PPAR-gama no sistema nervoso central, que eleva a sensação de fome) e insuficiência cardíaca (resultado da ativação do PPAR-gama nos túbulos coletores do néfron, que aumenta a reabsorção de sódio e leva à retenção de líquidos) (Marín-Peñalver et al., 2016).

Outras classes mais recentes de medicamentos antidiabéticos orais incluem: as gliptinas, inibidores da DPP-4, enzima responsável pela degradação do hormônio GLP-1 que estimula a secreção de insulina pelo pâncreas em resposta à glicose; análogos de GLP-1 (como o Ozempic®), aumentam a secreção de insulina pelo

pâncreas em resposta à glicose; e inibidores do transportador de sódio/glicose tipo 2 nos túbulos renais (SGLT-2), controlando os níveis de glicose ao inibir sua reabsorção, promovendo a eliminação de glicose pela urina, o que reduz o risco de hipoglicemia (Washburn, 2009).

Dada a complexidade do DM, que resulta em uma série de complicações crônicas, há um crescente interesse na investigação de novas estratégias terapêuticas alternativas e/ou complementares para o controle da doença. Essas estratégias buscam não apenas melhorar o controle glicêmico, mas também prevenir e atenuar as complicações associadas às doenças metabólicas (Dey; Attele; Yuan, 2002). Nesse contexto, estratégias que melhorem a tolerância à esses medicamentos sem comprometer sua eficácia anti-hiperglicemiante são necessárias. A combinação de metformina com compostos bioativos naturais, que possuam propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e antiglicação, tem sido sugerida como uma abordagem promissora para prevenir e/ou reduzir as complicações do DM tipo 2 e da obesidade associadas ao estresse glico-oxidativo (Arulselvan et al., 2016; Prabhakar; Kumar; Doble, 2014; Salehi et al., 2019; Yeh et al., 2017). Estudos recentes, como os conduzidos por Motta et al. (2022), Figueiredo et al. (2020, 2024), Gutierrez et al. (2019) e Roxo et al. (2019), têm explorado as interações sinérgicas entre compostos bioativos naturais e medicamentos antidiabéticos, com vistas à otimização dos resultados terapêuticos.

2.4. Própolis

A própolis, é um produto resinoso coletado por abelhas de várias fontes vegetais e de diversas partes das plantas como, brotos, botões florais e exsudados resinosos (Ghisalberti, 1979). Dentro da colônia, este material coletado é manipulado e enriquecido com secreções salivares e enzimáticas da própria abelha, sendo utilizado para: cobrir as paredes da colmeia, preencher frestas, como antibiótico e embalsamar possíveis insetos invasores (Bankova; Castro; Marcucci, 2000; Russo et al., 2004).

Este produto tem sido utilizado há muitos anos na medicina tradicional do mundo inteiro, os egípcios, gregos e romanos relataram o uso de própolis com finalidades curativas em geral há mais de 5.000 anos (Ghisalberti, 1979). Mesmo com um histórico respeitável de uso, que lhe rendeu o posto de “medicamento” natural, a própolis tem ganhado destaque nos últimos 25 anos, em parte, ao seu crescente

apelo popular, com uma estimativa de receita de 845,5 milhões (dólares) até o período de 2030, de acordo com levantamento feito pela Market Research Future (2023).

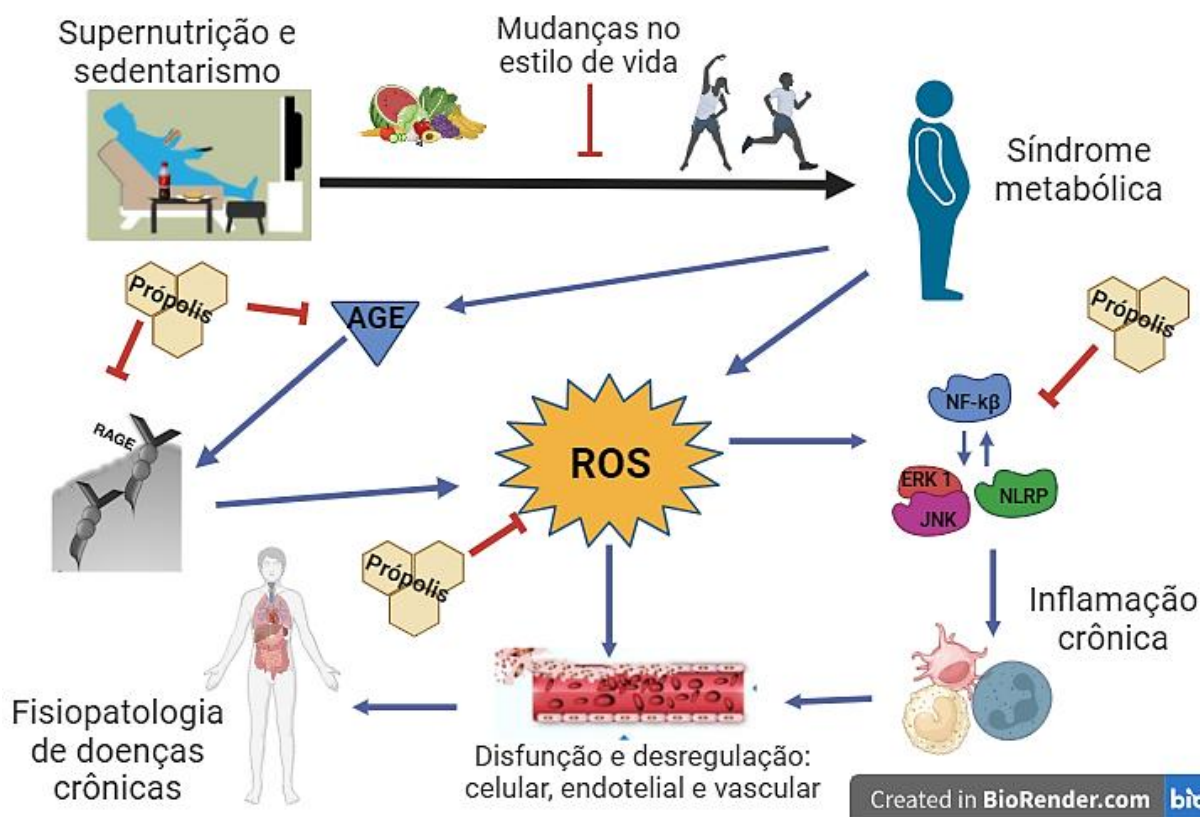
As propriedades biológicas já observadas em estudos pré-clínicos incluem atividade anti-inflamatória (Montpied et al., 2003), imunomoduladora (Sforcin, 2007), antimicrobiana (Cunha et al., 2004; Marcucci et al., 2001), antineoplásica (Aso et al., 2004; Nagai et al., 2003a; Orsolic; Basic, 2005) e antioxidante (Kumazawa; Hamasaka; Nakayama, 2004; Nagai et al., 2003b).

Evidências acumuladas indicam que a própolis apresenta efeitos benéficos para distúrbios metabólicos como obesidade, diabetes e complicações decorrentes da mesma em estudos modelos celulares (*in vitro*, *ex vivo*) e animais (Kitamura, 2019) (Figura 3). Uma proporção grande de artigos postula que os efeitos da própolis no distúrbio metabólico podem ser explicados pela atividade antioxidante de flavonoides e fenóis naturais (Al Ghamdi et al., 2015; Ibrahim et al., 2019; Nna et al., 2018; Rivera-Yañez et al., 2021), e ainda que estes compostos podem ser considerados de baixa toxicidade e baixa probabilidade de efeitos colaterais (Kitamura, 2019).

Relativo aos estudos clínicos realizados com diferentes tipos de própolis, fica evidente seu potencial antidiabético na terapia complementar, melhorando o status glicêmico e antioxidante, e reduzindo a resistência insulínica de pacientes com diabetes mellitus tipo 2 (Afsharpour et al., 2019; Hesami et al., 2019; Mujica et al., 2017; Samadi et al., 2017). Os parâmetros regulados pela própolis incluem aumento da capacidade antioxidante total (TAC), da atividade de enzimas antioxidantes, GPx, SOD (Afsharpour et al., 2019), e CAT (Hesami et al., 2019). Agindo também sobre o metabolismo lipídico, prevenindo o aumento de colesterol total e colesterol LDL no sangue (Samadi et al., 2017), bem como de sua forma oxidada (LDL-ox) (Hesami et al., 2019).

Em estudo recente, foi demonstrado o potencial da própolis verde brasileira como adjuvante para o tratamento de pacientes comprometidos pela doença do coronavírus 2019 (COVID-2019), resultando em benefícios clínicos aos pacientes hospitalizados, evidenciado pela redução do tempo de internação e taxas inferiores de lesão renal aguda associada a infecção pelo SARS-CoV-2 (Silveira et al., 2021).

Figura 3 - Os mecanismos de ação da própolis na melhora da síndrome metabólica (SM).



Fonte: adaptado de ZULHENDRI et al., 2021. Adaptado, utilizando BioRender.

2.5. Composição da própolis

A própolis extraída de uma colmeia, também conhecida como própolis bruta, apresenta em sua composição básica cerca de 50% de resinas vegetais, 30% de cera de abelha, 10% de óleos essenciais, 5% de pólen e 5% de detritos de madeira e terra, produtos estes que são retirados da vegetação próxima (Burdock, 1998). São desconhecidos os fatores que direcionam a preferência das abelhas coletoras de resina por uma determinada fonte vegetal, mas sabe-se que há seletividade por parte destas (Salatino et al., 2005; Teixeira et al., 2005).

A composição química de uma própolis é determinada principalmente por três fatores: as características fitogeográficas existentes ao redor da colmeia (Kumazawa; Hamasaka; Nakayama, 2004; Russo et al., 2004), a sazonalidade em uma mesma localidade (Castro et al., 2007; Sforcin et al., 2000), e a espécie/subespécies (raças) de abelhas envolvidas no processo de coleta e produção da própolis (Silici; Kutluca, 2005). Naturalmente a variação desses fatores para a produção da própolis bruta, reflete nas propriedades farmacológicas e toxicológicas das mesmas (Machado et al., 2016). A

amplitude das atividades farmacológicas da própolis é maior em regiões tropicais do planeta, devido à maior diversidade vegetal e menor nas regiões temperadas (Bankova, 2005). Em países de clima temperado, são poucas as plantas identificadas que produzem essa resina, enquanto que própolis oriundas de países tropicais (Venezuela, Brasil e Argentina) revelaram uma constituição química e atividades biológicas diferentes da própolis encontrada em países europeus e de outras partes do mundo (Lima et al., 2009; Marcucci, 1995; Negri; Salatino; Salatino, 2003; Pereira et al., 2003). No Brasil há uma grande variedade delas, sendo listadas em 13 tipos, de acordo com suas características físico-químicas (Park; Alencar; Aguiar, 2002).

Os principais compostos químicos isolados de própolis até o momento podem ser organizados em alguns grupos principais, como: ácidos e ésteres alifáticos, ácidos e ésteres aromáticos, açúcares, álcoois, aldeídos, ácidos graxos, aminoácidos, esteroides, cetonas, chalconas e di-hidrochalconas, flavonoides (flavonas, flavonóis e flavononas), terpenóides, proteínas, vitaminas (B1, B2, B6, C e E) e bem como diversos minerais (Bankova; Castro; Marcucci, 2000; Burdock, 1998; Marcucci, 1995; Sahinler; Kaftanoglu, 2005).

Entre os grupos de compostos, os flavonoides receberam muita atenção nas últimas três décadas, devido a seu histórico de participação em tratamentos médicos da antiguidade (Havsteen, 2002). Os flavonoides são uma subclasse de polifenóis, que compreendem um amplo grupo de compostos naturais não sintetizadas pelos animais e amplamente distribuídos nas plantas (Beecher, 2003; Manach et al., 2004). Cerca de 4.000 compostos diferentes já foram listados, entre eles apigenina, quercetina, rutina, luteolina, genisteína, daidzeína, antocianidina, kanferol e entre outros (Menezes, 2005). Essa classe de compostos expressa uma série de atividades biológicas, incluindo ações: antimicrobiana, antiviral, anti-inflamatória, antialérgica e anticâncer, além de inibir a peroxidação lipídica, a agregação plaquetária e inibir enzimas importantes do processo inflamatório como a ciclo-oxigenase e lipoxigenase (Manach et al., 2004; Viuda-Martos et al., 2008).

2.6. Própolis Vermelha Brasileira

Os 13 grupos de classificação da própolis brasileira, são caracterizados por suas diferenças qualitativas e quantitativas em sua composição química, a partir da aplicação de técnicas de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Cromatografia

Gasosa com Espectrometria de Massas (Park; Alencar; Aguiar, 2002). Neste contexto, a 13ª variedade de própolis relatada no Brasil, foi caracterizada e denominada de “Própolis Vermelha Brasileira” (PVB), sendo um tipo de própolis encontrado em colmeias, de abelhas *Apis mellífera*, próximas de regiões de mangue nos estados do nordeste de Alagoas, Sergipe, Bahia, Pernambuco e Paraíba (Park; Alencar; Aguiar, 2002; Silva et al., 2008), visto que, esta é a primeira vez que a origem botânica de um tipo de própolis é descrito ocorrer em uma espécie da família Leguminosae, a planta *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub., que é uma família de plantas conhecidamente rica em isoflavonóides (Silva et al., 2008).

Recentemente, o estudo de Migliore e colaboradores (2022), elucidou uma importante etapa do processo de produção de resina do *D. ecastophyllum*, descrevendo uma nova espécie de besouro coleóptero, nomeado *Agrilus propolis* sp. nov.. A emergência de indivíduos adultos do tronco de plantas parasitadas por ovos deste besouro, estimula a produção de uma resina que será coletada pelas abelhas, tornando o *A. propolis* como o agente responsável por desencadear a liberação da matéria prima da produção de própolis vermelha brasileira, ampliando a compreensão do seu ciclo produtivo (Migliore et al., 2022).

De acordo com Silva e colaboradores (2008), os principais constituintes dos extratos obtido do *D. ecastophyllum* são os isoflavonóides, medicarpin e 3-Hydroxy-8,9- dimetoxipterocarpan, este último representando mais de 60% da composição em ambos os extratos a partir da análise de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS), sendo também identificados, quercetina e crisina (flavonoides), e ácido ferúlico (um ácido fenólico). Resultados semelhantes foram descritos por Trusheva e colaboradores (2006) que observaram a presença de isoflavonóides, como isosativan e medicarpin, em amostras de PVB, indicando grande potencial antibacteriano e antifúngico.

Alencar e colaboradores (2007), demonstraram que a PVB proveniente do estado de Alagoas, apresenta atividade antioxidante e antimicrobiana contra vários microrganismos patogênicos em ensaios preliminares *in vitro*, além de atividade citotóxica em células tumorais HeLa. Através de sua atividade antioxidante, a PVB diminui substancialmente a porcentagem de sobrevivência celular de células tumorais humanas de glioblastoma, ovário e cólon, e essa ação foi atribuída devido

as altas taxas de taninos, xantonas e flavonoides; assim, tem potencial para servir como uma droga anticancerígena (Mendonça-Melo et al., 2017).

Oldoni e colaboradores (2011) isolaram e identificaram, através de técnicas de fracionamento guiado por bioensaios, dois isoflavonóides (vestitol e neovestitol) e uma chalcona (isoliquiritigenina); a análise destes componentes, em relação a sua atividade antioxidante e antimicrobiana, revelou um interessante potencial para aplicação na indústria. Neste contexto, Bueno-Silva e colaboradores (2013b) avaliaram a atividade anti-inflamatória e antimicrobiana do vestitol e neovestitol, observando ser estes isoflavonóides capazes de reduzir o processo inflamatório em camundongos, inibindo a produção de óxido nítrico e a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal após aplicação destes componentes, com destaque ao neovestitol atuando em menores concentrações e sendo assim, a PVB é uma fonte natural de compostos bioativos.

Os dados existentes até o momento, indicam também que a PVB consegue atenuar o processo inflamatório alterando a sinalização em macrófagos derivados de monócitos, em modelos de exposição ao lipopolissacarídeo (LPS), induzindo uma menor produção de alguns mediadores pró-inflamatórios (IL-1 e IL-12), interferindo na resposta TLR (Toll-like receptor), levando a inibição das vias de sinalização de NF- κ B, MAPK e PI3K, regulando diferentemente diversos genes envolvidos no processo inflamatório (Bueno-Silva et al., 2015).

De acordo com Hotta e colaboradores (2020), a PVB aumentou as defesas antioxidantes mediadas pelo Nrf2. Os autores relatam que os compostos isoliquiritigenina e medicarpin induziram uma transativação mais forte e aumentaram o mRNA de diversos genes antioxidantes, especialmente Heme Oxygenase 1 (HMOX1). Enquanto que no estudo de Barbosa Bezerra (2017), a administração do extrato hidro-etanólico de PVB (HERP) reduziu o processo inflamatório em modelo de lesões ulcerativas dos tecidos do cólon, no qual, a diminuição da resposta inflamatória é indicativa de controle do estresse oxidativo ocasionado por ERO.

Torna-se relevante observar que essa diversidade química confirma o valor da PVB no desenvolvimento de fármacos, transformando-a em uma importante fonte de novos compostos com propriedades terapêuticas e/ou nutracêuticos que podem ser usados nas indústrias alimentícia e farmacêutica (Bueno-Silva et al., 2015).

Neste cenário, Santos e colaboradores (2019) avaliaram a utilização da PVB como conservante na produção de iogurte, relatando melhor atividade antioxidante

em comparação com iogurte preparado com sorbato de potássio. A adição de própolis na formulação também inibiu o crescimento microbiano de acordo com os padrões brasileiros para leites fermentados, sem afetar negativamente as bactérias lácticas, aumentando o potencial probiótico do iogurte (Santos et al., 2019).

Em geral, os consumidores têm mostrado uma preferência por alimentos que não contenham aditivos ou ingredientes industriais, como observado em estudos anteriores (Carocho et al., 2014). Uma nova tendência na percepção do consumidor em relação a produtos alimentícios é o conceito de "rótulo limpo" (Cheung et al., 2016). O rótulo limpo tem influenciado a indústria alimentícia a comunicar se um determinado alimento não contém ingredientes ou aditivos específicos, ou se foi produzido utilizando métodos de produção mais naturais (Asioli et al., 2017).

O iogurte é um dos alimentos lácteos mais consumidos no mundo apresentando grande valor nutricional como fonte de proteína, cálcio, fósforo, zinco, riboflavina, tiamina, vitamina B12, folato e niacina, e propriedades organolépticas positivas. Outros benefícios associados ao consumo de iogurte incluem a diminuição na absorção intestinal e nos níveis circulantes de colesterol (Anderson; Gilliland, 1999), redução da obesidade e outros fatores de risco cardiovascular (Astrup, 2014) e melhora do sistema imune (Ashraf; Shah, 2014). Também crescem as evidências epidemiológicas que relacionam a ingestão diária de iogurte com a redução na incidência do DM tipo 2 (Yanni; Kartsioti; Karathanos, 2020).

O iogurte enriquecido com PVB é uma alternativa eficiente em sua produção, oferecendo benefícios à saúde e potencial como aditivo natural, bem como, contribuindo para a pesquisa de novos produtos funcionais no mercado alimentício e promovendo uma dieta mais saudável (Santos et al., 2019).

Contudo, destaca-se a importância de avaliar as atividades biológicas de um produto natural para um determinado quadro clínico antes de sugerir seu uso para fins terapêuticos em humanos, exigindo estudos das mais diversas áreas para assegurar os possíveis riscos de sua utilização a curto e longo prazos. A PVB é um produto que tem recebido destaque e a extensão das suas atividades biológicas não foi completamente explorada. Sendo assim, devido ao seu grande potencial e a estudos envolvendo outros tipos de própolis em modelo experimental de obesidade e diabetes, a investigação da PVB e sua aplicabilidade para este quadro é promissora.

3. Objetivos

Objetivo geral - Avaliar os efeitos da própolis vermelha brasileira, sozinha ou coadministrada com metformina, em sistemas-modelo *in vivo*, sobre biomarcadores do estresse glico-oxidativo, lipoperoxidação e alterações fisiometabólicas relacionadas a obesidade e resistência à insulina.

Objetivos específicos – Avaliar os efeitos da própolis vermelha brasileira sobre:

- a) Parâmetros fisiológicos (peso corporal e ingestão alimentar) e massas dos tecidos corporais (tecidos adiposos branco epididimal e retroperitoneal, tecido adiposo marrom interescapular, músculos *gastrocnemius*, fígado, rim e coração);
- b) Tolerância à glicose e sensibilidade à insulina, via teste de tolerância a glicose oral (TTGO) e teste de tolerância a insulina (ITT);
- c) Níveis de biomarcadores plasmáticos relacionados ao metabolismo de carboidratos e lipídeos, integridade hepática e função renal: glicose, triacilglicerol, colesterol total, colesterol da lipoproteína de alta densidade (HDL-colesterol), alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (ALP), ureia, ácido úrico e de proteínas totais.
- d) Níveis de biomarcadores de lipoperoxidação (TBARS) no plasma e sobrenadantes de fígado e rim;
- e) Níveis de biomarcadores de glicação avançada (AGEs fluorescentes) no plasma e sobrenadantes de homogenatos de fígado e rim;
- f) Atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx nos sobrenadantes de homogenatos de fígado e rim;
- g) Atividade da enzima antioxidante paraoxonase 1 (PON1) no plasma;

4. Material e Métodos

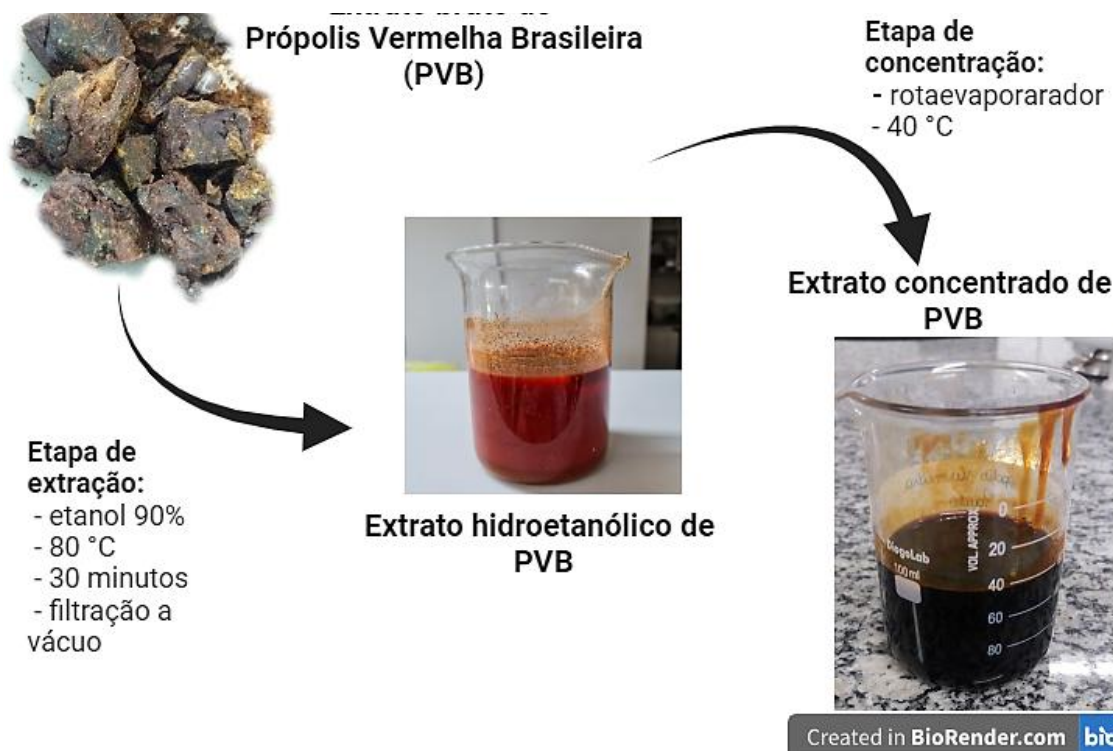
4.1. Amostra de própolis vermelha brasileira (PVB)

4.1.1. Obtenção do extrato hidroetanólico de PVB

A própolis vermelha foi coletada raspando o interior das caixas de abelhas *Apis mellifera* na região litorânea de Marechal Deodoro (no Nordeste do Brasil, clima tropical úmido, 9°40'S e 35°41'W), sendo retirado a poeira, pedaços de madeira, abelhas mortas, traças e qualquer outro tipo de material estranho. Em seguida, foram trituradas, peneiradas, homogeneizadas, pesadas e armazenadas a 5°C. As amostras de própolis foram generosamente cedidas pelos pesquisadores colaboradores: Masaharu Ikegaki, Pedro Rosalen e Severino Alencar. A pré-aprovação legal para avaliação desta própolis foi obtida junto ao Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimentos Tradicionais Associados (SisGen), Registro A305815).

A amostra de própolis (50 g) foi extraída com etanol/água 90% (v/v) (350 mL) em banho-maria, a 80°C, por 30 min e posteriormente submetida à filtração a vácuo para obtenção do seu extrato hidro-etanólico. As condições de extração descritas são parte do método otimizado para recuperação de compostos antioxidantes de PVB descritos por Vieira de Moraes e colaboradores (2021). A solução foi concentrada em um rota-evaporador a 40°C para obtenção do extrato concentrado de própolis vermelha (Alencar et al., 2007) (Figura 4).

Figura 4 - Obtenção do extrato hidroetanólico de própolis vermelha brasileira.



Fonte: do autor, 2023. Criado com BioRender.

4.1.2. Caracterização dos compostos fenólicos por espectrometria de massa de alta resolução (LC-ESI-QTOF-MS/MS)

A avaliação qualitativa da composição do extrato hidroetanólico de PVB utilizado em nosso trabalho foi realizada pelos pesquisadores colaboradores da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP de Piracicaba) e os resultados encontrados foram publicados no estudo de Vieira de Moraes (2021). A análise revelou a presença de 32 compostos fenólicos no extrato de PVB, incluindo flavonas, flavononas, flavonóis, chalconas, isoflavonóides, quinona, cumarina e seus derivados, apresentados na Tabela Suplementar 1.

4.1.3. Determinação da atividade antioxidante da Própolis Vermelha, utilizando o sistema-modelo em meio micelar com β -caroteno/AAPH (2,2'-Azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride)

O preparo da mistura reativa para incorporação das amostras em meio micelar foi adaptado de acordo com Duarte-Almeida (2006). A mistura reativa padrão

consiste de detergente (Tween 40) e solução de β -caroteno em n-Hexano; o n-hexano foi evaporado completamente sob fluxo de nitrogênio gasoso, com agitação e temperatura (40°C) constantes; posterior adição de tampão fosfato de sódio 0,12 mol/L, pH 7,0, e subsequente agitação vigorosa. A incorporação do β -caroteno em micelas deverá apresentar-se límpida e então monitorada pelo seu espectro de absorção de 400 - 600 nm. A amostra de própolis vermelha foi preparada de modo semelhante, porém, para incorporação em meio micelar foi utilizado detergente (Tween 40) e etanol 90%, que foi evaporado completamente sob fluxo de nitrogênio gasoso, como descrito acima.

O ensaio do clareamento (*bleaching*) do β -caroteno foi realizado pelo monitoramento do decréscimo da absorbância do β -caroteno em 470 nm, durante 10 minutos em um procedimento de competição cinética (ASSIS et al. 2015); a reação foi iniciada pela adição do AAPH, a 40°C em meio aerado e velocidade constante, medindo a capacidade redutora da PV sobre os radicais peroxila ($\text{ROO}\cdot$). O Hidroxitolueno butilado (BHT) e Vitamina E, foram utilizados como padrões.

4.2. Animais, dietas e tratamentos

Foram utilizados 105 camundongos machos (C57BL/6J), com peso de 22 g e 8 semanas de idade. Os animais permaneceram no Biotério do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” (UNESP - Araraquara) e alojados sob luz controlada (ciclo de 12/12 horas claro e escuro) e temperatura (23°C), com acesso à água e ração *ad libitum*.

Após período de adaptação (2 semanas), os animais foram alimentados durante todo o período experimental (16 semanas) com dieta preparada padrão (P; 3,85 Kcal/g) ou hiperlipídica (H; 5,40 Kcal/g; 35% de lipídeos) (Reeves; Nielsen; Fahey, 1993), provenientes da PragSoluções Biociências (Domeneghetti e Corrêa Ltda), Jaú, São Paulo (Tabela 1).

Tabela 1 - Composição das dietas padrão (P) e hiperlipídica (H)

Ingredientes	Dieta Padrão (P)	Dieta Hiperlipídica (H)
	(g / 100 g)	(g / 100 g)
Amido de milho	42,75	14,95
Caseína	20	20
Amido Dextrinizado	13,2	10
Sacarose	10	10
Óleo de Soja	4	4
Celulose Microcristalina	5	5
Mix de Minerais ⁽¹⁾	3,5	3,5
Mix de Vitaminas ⁽²⁾	1	1
L-cistina	0,3	0,3
Bitartarato de colina	0,25	0,25
Banha	--	31
Total	100	100

(1) Mix de minerais: cálcio, fósforo, potássio, magnésio, ferro, manganês, selênio, zinco, cromo, níquel, lítio, enxofre, cobre, iodo, molibdênio, silício, cloreto, fluoreto, boro, vanádio. (2) Mix de vitaminas: ácido nicotínico, pantotenato de cálcio, piridoxina, tiamina, riboflavina, ácido fólico, vitamina K, D-biotina, vitamina B12, vitamina A, vitamina D3, vitamina E, colina.

Foi selecionada a dose de 100 mg de PVB / por kg do animal, com base em estudos onde o extrato foi administrado por via oral para ratos e camundongos em modelos de toxicidade (aguda e sub-aguda) (Silva et al., 2015) e atividade biológica (antiinflamatória, antitumoral e ulcerogênica) (Madjarof, 2009). A dose utilizada de metformina (99.56% metformina hydrochloride, Abhilash Chemicals and Pharmaceuticals, Madurai, Tamilnadu, India) foi de 50 mg / por kg do animal, foi selecionada com base em estudos onde o fármaco foi administrado para camundongos em modelo de obesidade/resistência insulínica via oferta de dieta hiperlipídica (Kim et al., 2016; Li et al., 2016).

O extrato concentrado de PVB foi incorporado com iogurte simples comercial (iogurte Natural Integral, 170 g contendo 9,1 g de carboidratos, 6,8 g de proteína, 7,0

g de gordura total, 126 kcal, Nestlé®, Brasil), sozinho ou em combinação com metformina usando um homogeneizador (27.000 rpm) por 90s à temperatura ambiente (25°C). O iogurte (sozinho ou contendo própolis e/ou metformina) foi administrado por gavagem aos animais em um volume de 0,2 mL/dia.

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, Campus de Araraquara (Protocolo CEUA/FCF/CAr: 27/2021).

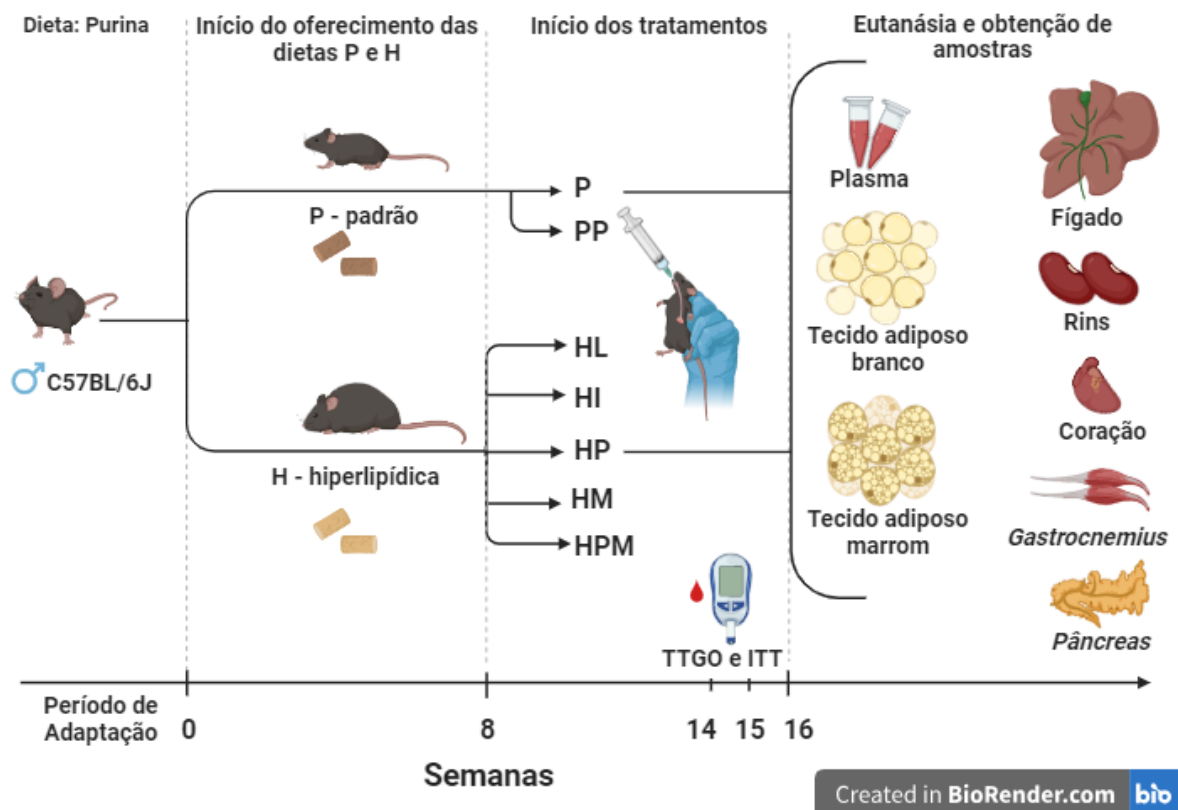
4.3. Delineamento experimental e obtenção de amostras biológicas

O delineamento experimental do estudo foi representado na figura 5. Após 8 semanas de oferecimento da dieta, os camundongos foram distribuídos em sete grupos experimentais (n = 15):

1. Grupo P: animais alimentados com dieta padrão (P) e tratados com água;
2. Grupo PP: animais alimentados com dieta P e tratados com própolis vermelha (100 mg/kg de peso corporal) em iogurte;
3. Grupo HL: animais alimentados com dieta hiperlipídica (H) e tratados com água;
4. Grupo HI: animais alimentados com dieta H e tratados com iogurte;
5. Grupo HP: animais alimentados com dieta H e tratados com própolis vermelha (100 mg/kg de peso corporal) em iogurte;
6. Grupo HM: animais alimentados com dieta H e tratados com metformina (50 mg/kg de peso corporal) em iogurte;
7. Grupo HPM: animais alimentados com dieta H e tratados com própolis vermelha (100 mg/kg) + metformina (50 mg/kg) em iogurte.

Os tratamentos aos animais foram iniciados após 8 semanas de oferta das dietas e realizados via oral (gavagem), diariamente na parte da manhã (8 horas), durante 8 semanas. Durante este período foram monitorados o peso corporal (duas vezes por semana) e a ingestão alimentar (todos os dias).

Figura 5 - Delineamento experimental de camundongos submetidos ao modelo de obesidade/resistência insulínica por 16 semanas, tratados com própolis e metformina isolados ou em combinação, incorporados ao iogurte. Dieta P: padrão; Dieta H: hiperlipídica; P: grupo tratado com água; PP: grupo tratado com PVB; HL: grupo tratado com água; HI: grupo tratado com iogurte; HP: grupo tratado com PVB; HM: grupo tratado com metformina; HPM: grupo tratado com própolis + metformina; TTGO: teste de tolerância a glicose oral; ITT: teste de tolerância a insulina.



Fonte: do autor, 2023. Criado com BioRender.

4.4. Homeostase da glicose

O teste de tolerância à glicose oral (TTGO) foi realizado após 6 semanas de tratamento (14 semanas de experimento). Os animais foram jejuados por 12 horas e a glicemia determinada antes (0 min) e depois (15, 30, 60, 90 e 120 min) da sobrecarga de glicose (1,5 g/kg, via oral), através da obtenção de uma pequena gota de sangue por punção da porção distal da cauda. A glicemia foi determinada com a utilização de um glicosímetro (Abbott, Freestyle Optium®).

O teste de tolerância à insulina (ITT) foi realizado após 7 semanas de tratamento (15 semanas de experimento). Os animais foram jejuados por 2 horas e a glicemia determinada antes (0 min) e depois (15, 30, 45, 60 min) da administração de insulina (0,4 U de insulina, Novolin R®, via intraperitoneal), como descrito acima.

4.5. Eutanásia e processamento de material biológico

Ao final do tratamento, 8 semanas (16 semanas de experimento), todos os animais foram jejados por 6 horas, anestesiados (xilazina, 16 mg/kg; quetamina 90 mg/kg) e em seguida, 4 animais (de todos os grupos) receberam insulina (3,8 UI/kg peso corporal, Novolin R®, via intraperitoneal) para o estudo dos níveis de fosforilação de AKT (proteína quinase B) em tecidos adiposos, músculos esqueléticos, fígado e rim. Como controle, o restante dos animais recebeu salina (0,85%, via intraperitoneal). Após 10 minutos dos estímulos, foi realizada a eutanásia dos animais via punção cardíaca e exsanguinação total. Amostras de sangue foram coletadas em tubos de microcentrifuga (1,5 mL Eppendorf®) contendo heparina (Hemofol®) e imediatamente centrifugadas (2500 rpm durante 10 minutos a 4°C) para obtenção do plasma para análises bioquímicas e armazenadas a -80°C. Foram retirados e pesados os tecidos adiposos brancos epididimal e retroperitoneal, tecido adiposo marrom interescapular, músculos esqueléticos *gastrocnemius*, fígado, coração e rins. Os tecidos e órgãos retirados foram imediatamente congelados (-80°C) ou encaminhados para processamento histológico.

4.6. Determinações analíticas

4.6.1. Biomarcadores do metabolismo de carboidratos, lipídios e das disfunções hepática e renal

Os níveis plasmáticos de glicose, triacilglicerol, colesterol total, colesterol da lipoproteína de alta densidade (HDL-colesterol), fosfatase alcalina (ALP), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), ureia e ácido úrico foram determinados utilizando kits comerciais da Vitros Chemistry Products (Ortho Clinical Diagnostics ®) através dos métodos descritos abaixo:

- **Glicemia, método da glicose-oxidase** (Trinder, 1969)

A camada de difusão dos slides contém as enzimas glicose oxidase e peroxidase, e também 4-aminoantipirina e 1,7-diidroxinaftaleno para produzir um reagente de cor. A glicose oxidase catalisa a oxidação da glicose à ácido glucônico e H_2O_2 , este reage com 4-aminoantipirina, sob a ação de peroxidase, formando uma antipirilquinonimina, cuja intensidade de absorção é proporcional à concentração da glicose na amostra.

- **Triacilgliceróis, método enzimático de reações acopladas** (RIFAI; WARNICK, 2006)

Os triacilgliceróis presentes na amostra são inicialmente hidrolisados pela lipase, produzindo glicerol e ácidos graxos livres. O glicerol produzido é fosforilado pela gliceroquinase, produzindo glicerol-3-fosfato, por sua vez, é oxidado à dihidroxiacetona e H_2O_2 sob ação da glicerol-3-fosfato oxidase. O H_2O_2 participa da oxidação de 4-aminoantipirina, pela ação catalizadora da peroxidase, gerando quinoneimina, sendo diretamente proporcional à concentração dos triacilgliceróis na amostra.

- **Colesterol total: método do colesterol oxidase** NUGENT, M. M.; HE, J. C. How AGEs cause disease: cellular mechanisms. In: URIBARRI, J. (editor). Dietary AGEs and Their Role in Health and Disease. 1. ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2017. p. 19-36.

A hidrólise dos ésteres de colesterol presentes na amostra é catalisada pelo colesterol esterase. O colesterol agora livre é oxidado na presença do colesterol oxidase, resultando em colest-4-em-3-ona e H_2O_2 . Na presença de peroxidase, o produto final formado é a antipirilquinonimina, cuja intensidade de absorção é proporcional à concentração de colesterol na amostra.

- **HDL - colesterol, método de precipitação do colesterol não-HDL seguido por detecção enzimática** (Allain et al., 1974; Burstein; Scholnick; Morfin, 1970)

As HDL são separadas por precipitação das não-HDL. O surfactante Emulgen B-66, auxilia a dissociação seletiva do colesterol e ésteres de colesterol. Em seguida, ocorre a ação de colesterol esterase, colesterol oxidase e peroxidase, resultando na formação de um cromóforo que é diretamente proporcional à concentração de colesterol presente no colesterol-HDL da amostra.

- **Fosfatase alcalina (ALP)**

A camada de difusão dos slides contém o substrato p-nitrofenilfosfato. A ALP presente na amostra catalisa a hidrólise do p-nitrofenilfosfato em p-nitrofenol em pH alcalino. A alteração da densidade da reflectância é proporcional à atividade de AST na amostra.

- **Aspartato aminotransferase (AST)**

A AST catalisa a transferência do grupo amina do ácido aspártico para o cetoglutarato, resultando em glutamato e oxalacetato. Por ação de uma descarboxilase o oxalacetato é convertido em piruvato, por sua vez é oxidado em

acetilfosfato e H_2O_2 por ação da piruvato oxidase. O corante leuco é oxidado pelo peróxido de hidrogênio por meio da ação da peroxidase, resultando em um corante. A alteração da densidade da reflectância é proporcional à atividade de AST na amostra.

- **Alanina aminotransferase (ALT)**

A camada de difusão dos slides contém os substratos alanina e α -cetoglutarato de sódio. A ALT catalisa a transferência do grupo amino da alanina para o α -cetoglutarato, na presença do piridoxal-5-fosfato, produzindo piruvato e oxaloacetato; o piruvato é oxidado à acetilfosfato, resultando em H_2O_2 via uma oxidase de piruvato. Na presença de uma peroxidase, ocorre a formação de cromóforo. A alteração da densidade da reflectância é proporcional à atividade de ALT na amostra.

- **Ácido úrico, método da uricase** (Kageyama, 1971; Trivedi et al., 1978)

O ácido úrico presente na amostra é oxidado na presença de uricase, formando alantoína e peróxido de hidrogênio. O corante leuco é oxidado pelo peróxido de hidrogênio por meio da ação da peroxidase, resultando em um corante. A alteração da densidade da reflectância é proporcional a concentração de ácido úrico presente na amostra.

- **Ureia, método da urease** (Sampson et al., 1980)

A ureia presente na amostra é hidrolisada pela urease, liberando CO_2 e NH_3 . Somente a amônia migra pela membrana semipermeável do slide, reagindo com a camada formadora de cor, produzindo um complexo de cor esverdeada. A alteração da densidade da reflectância é proporcional a concentração de ureia presente na amostra.

4.6.2. Biomarcadores de peroxidação lipídica: determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (*thiobarbituric acid reactive substances*)

Amostras de fígado e rins foram homogeneizados em solução tampão de cloreto de potássio (1,15%), a 4°C, na proporção 1:4. Os homogenatos foram centrifugados a 10000 rpm, por 10 minutos, a 4°C. Com o sobrenadante obtido, prosseguiu-se com a análise.

Para quantificação dos níveis de TBARS, as amostras (plasma e sobrenadantes de fígado e rins) foram submetidas à desproteinização. Adicionou-se

hidróxido de sódio (1,5 M) e as amostras foram incubadas por 30 minutos a 60°C. Após o resfriamento em banho de gelo, foi adicionado ácido perclórico (10%) e as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C (Pilz; Meineke; Gleiter, 2000).

Os níveis de TBARS foram determinados no sobrenadante obtido, após reação com ácido tiobarbitúrico (TBA, 10 mM solubilizado em solução de fosfato de potássio monobásico, 75 mM, pH 2,5). Os níveis de TBARS no fígado e nos rins foram determinados em espectrofotômetro à 535 nm e expressos em $\mu\text{mol/g}$ de tecido (Kohn; Liversedge, 1944). Foi utilizado o 1,1'3,3'-tetrametoxipropano como padrão e construído uma curva de calibração para o ensaio, expresso em $\mu\text{mol/L}$ (Figura Suplementar 1). Os níveis de TBARS nas amostras de plasma foram determinados em espectrofluorímetro em comprimentos de onda de excitação e emissão de 510 nm e 553 nm, respectivamente, e expressos em $\mu\text{mol/L}$.

4.6.3. Biomarcadores de glicação avançada: estimativa dos produtos finais de glicação avançada (AGE) no plasma, fígado e rins

Fígado e rins foram homogeneizados em tampão fosfato de sódio (10 mM, pH 7,4), a 4°C, na proporção 1:10. Para obtenção dos sobrenadantes de fígado, as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C.

Ao plasma e sobrenadantes de fígado, foram acrescentados ácido tricloroacético (0,12 M), hidróxido de sódio (0,1 M) e clorofórmio (1,2 M em plasma e 2,4 M em fígado) (Zilin et al., 2001). Ao homogenato das amostras de rins, adicionou-se apenas hidróxido de sódio (0,12 M) (Pokupec et al., 2003). As amostras de plasma e fígado foram homogeneizadas e mantidas em geladeira (8°C) por 30 minutos para separação das fases aquosa e clorofórmica.

As amostras de plasma, fígado e rins foram centrifugadas a 10000 rpm, durante 10 minutos, sob temperatura de 10°C. A fase aquosa foi utilizada para determinação de AGE fluorescentes, nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 370 nm e 440 nm, respectivamente, e ganho de 150 (Synergy H1 Hybrid Reader, BioTek®). Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias de fluorescência (U.A.) /mg de proteína.

4.6.4. Biomarcadores relacionados à atividade antioxidante

As amostras de fígado e rins (0,1g) foram homogeneizadas em 1 mL de tampão fosfato de sódio (10 mmol/L, pH 7,4) a 4°C. Os homogenatos foram centrifugados a 10000 rpm durante 10 minutos a 4°C e os sobrenadantes foram utilizados para as análises das atividades de superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) em espectrofotômetro.

A atividade da SOD foi determinada de acordo com Beauchamp e Fridovich (1971), onde a oxidação da xantina (5 mM) gera o ânion superóxido sob a atividade catalítica da xantina oxidase, o qual reduz o *nitroblue tetrazolium* (NBT, 10 mM) à uma formazana. Na presença de SOD ocorre inibição da redução do NBT, monitorada em 550 nm. Os resultados foram expressos em U de SOD/mg de proteína (fígado e rins). Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima necessária para inibir a redução do NBT em 50%.

A atividade da CAT foi determinada pelo monitoramento do desaparecimento do H₂O₂ (10mM) em 230 nm (BEERS; SIZER, 1952). Os resultados foram expressos em µmol de H₂O₂ consumido/min/mg de proteína (fígado e rins).

Os níveis de atividade da GPx foram determinados de acordo com o método descrito por Rush e Scandiford (2003). A GPx catalisa a oxidação de GSH (1,5 mM) na presença de H₂O₂ (1,95 mM). Na presença de glutathione redutase (GR, 1,8 U/mL), a glutathione oxidada (GSSH) é reduzida à GSH com oxidação concomitante do NADPH à NADP⁺. A oxidação do NADPH é monitorada pela diminuição da absorbância em 340 nm. Os resultados foram expressos em µmol de NADPH consumido/min/mg de proteína (fígado e rins).

A atividade da enzima paraoxonase 1 (PON 1) no plasma foi determinada via hidrólise de paraoxon e subsequente liberação de p-nitrofenol (Assis et al., 2017; Costa et al., 1990). O ensaio é constituído de 10 µL de plasma em tampão Tris-HCl (15 mM; pH 8,5), contendo CaCl₂ (0,15 mM) e NaCl (0,3 M) e paraoxon (1,2 mM). A formação de p-nitrofenol foi monitorada em espectrofotômetro (405 nm) a 37°C por 5 minutos e os resultados calculados assumindo o coeficiente de extinção molar do produto de 18000 M⁻¹cm⁻¹ (Richter; Jarvik; Furlong, 2008). Os resultados foram expressos em U / mg HDL-colesterol (U, unidade = µmol de paraoxon hidrolisado / min).

4.6.5. Dosagem de proteínas totais em sobrenadantes de fígado e rins

As concentrações de proteínas nos sobrenadantes de fígado e rim foram determinadas segundo Lowry e colaboradores (1951), utilizados para corrigir os valores de atividade enzimática nestes tecidos (dados não mostrados). O reagente Folin-Ciocalteu (mistura de molibdato, tungstato e ácido fosfórico) sofre redução ao reagir com proteínas, na presença de cobre (II) produzindo um cromóforo azul monitorado espectrofotometricamente a 660 nm. Foi utilizado a albumina sérica bovina (BSA) como padrão para a quantificação de proteínas nas amostras, expresso em $\mu\text{g/mL}$ (Figura Suplementar 2).

4.7. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão. Após verificação da normalidade e homoscedasticidade dos dados, os mesmos foram analisados por análise de variância One-way (ANOVA) seguida por Tukey, para comparações inter-grupos. Para as comparações intra-grupos foi utilizado o teste t Student. Valores de $p < 0,05$ foram considerados como indicativos de significância. Todas as análises descritas, foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism[®] 8.0.

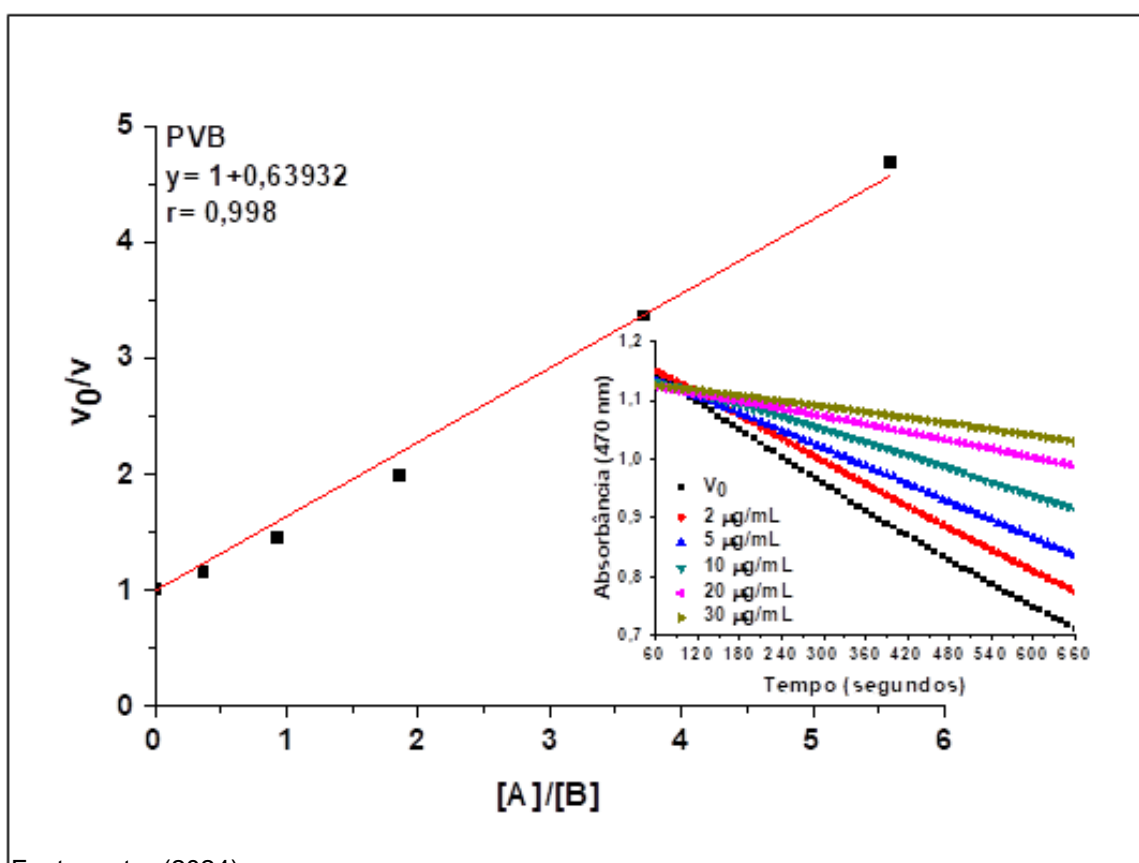
5. Resultados

5.1. Determinação da capacidade antioxidante da Própolis Vermelha no ensaio do *bleaching* do β -caroteno/AAPH em meio micelar (Tween 40)

Com o objetivo de confirmar a ação antioxidante da PV, foi realizado o ensaio do *bleaching* do β -caroteno em meio micelar (em Tween 40), que está apresentado na figura 6 e tabela 2.

Ao observar os resultados utilizando o valor de inclinação da regressão linear e EC50, é possível inferir que a PV mesmo em baixas concentrações (30 $\mu\text{g/mL}$) foi capaz de reduzir a velocidade de *bleaching* do β -caroteno, quando comparado com os padrões BHT e vitamina E, uma vez que, quanto menor o valor do EC50, mais eficiente é a amostra como antioxidante, enquanto para a inclinação da regressão linear é o inverso, quanto maior seu valor, maior é o potencial antioxidante.

Figura 6 - Representação entre as razões das velocidades de *bleaching* e das concentrações de vitamina E, no ensaio do clareamento do β -caroteno na presença do extrato etanólico de própolis vermelha brasileira (EEPV), em Tween 40. Queda de absorbância do β -caroteno, a 470 nm, na ausência (v_0) e presença (v) de EEPV ($\mu\text{g/mL}$), em função do tempo (10 minutos). v_0 , velocidade na ausência de EEPV; v , velocidade na presença de EEPV; $[B]$, concentração de β -caroteno constante (10 $\mu\text{mol/L}$) e $[A]$, concentração de EEPV.



Fonte: autor (2024).

Os resultados neste modelo indicam o potencial do EEPV em proteger um substrato lipídico, monitorada pela oxidação do β -caroteno e determinada por meio da atividade de inibição do radical peroxila ($\text{ROO}\cdot$) gerado a partir da termólise do AAPH. Comparativamente aos padrões comerciais utilizados, a PV se mostrou eficiente em sua ação antioxidante neste modelo *in vitro*, sendo promissor sua aplicação em modelos *in vivo*.

Tabela 2 - Valores de coeficiente angular e EC₅₀ da PVB para o ensaio de clareamento do β -caroteno.

Amostra	Inclinação da Regressão Linear	EC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
BHT	1,8116	5,3
Vitamina E	1,3218	7,3
PVB	0,6393	16,2

Fonte: autor (2024).

5.2. Parâmetros fisiológicos de camundongos em modelo de obesidade e resistência à insulina

5.2.1. Evolução do peso corporal

Na figura 7A, pode-se observar a evolução do peso corporal de animais dos diferentes grupos experimentais durante 16 semanas de experimento. A partir da terceira semana de experimento os grupos de animais alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram um aumento significativo de peso corporal quando comparados com os animais dos grupos que consumiram dieta padrão (grupos P e PP), sinalizando a instalação do quadro de obesidade neste modelo. Até a oitava semana (a linha tracejada indica o início dos tratamentos), os grupos de animais alimentados com dieta hiperlipídica não apresentavam diferenças entre si em relação ao peso corporal.

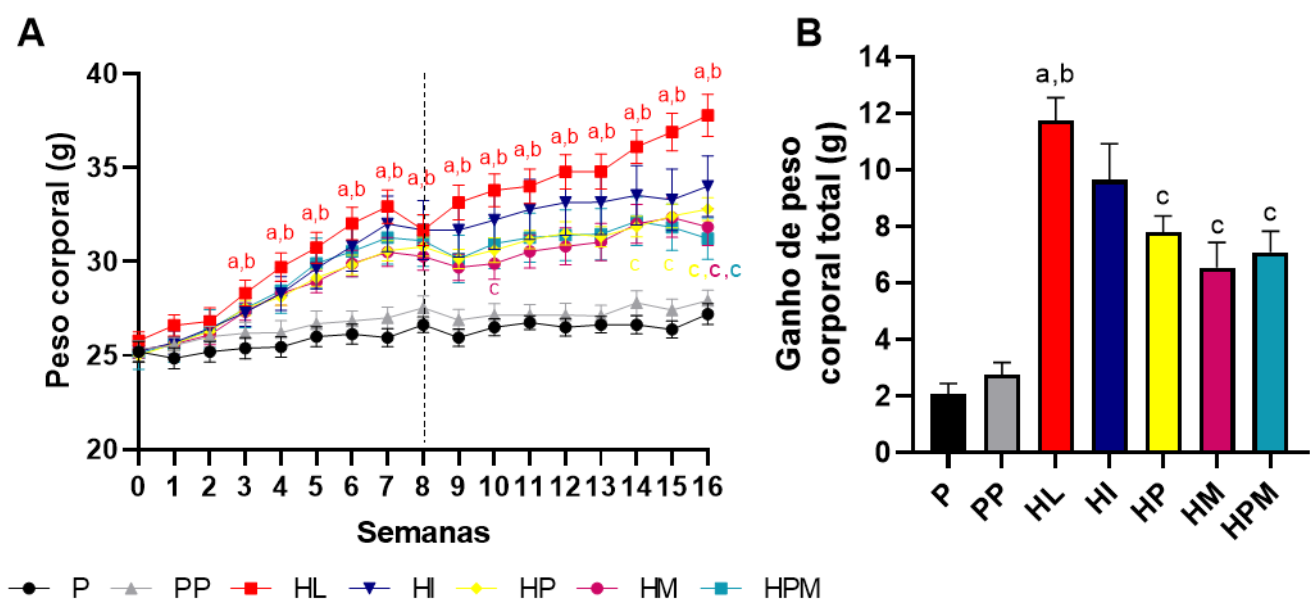
Após a oitava semana de experimento, com o início dos tratamentos, a média de peso corporal do grupo HL continuou aumentando, mantendo uma diferença significativa do peso corporal dos animais dos grupos P e PP. Quando os animais alimentados com dieta HL receberam o tratamento com iogurte (grupo HI), é possível observar uma pequena redução da média de peso corporal comparado ao grupo HL, contudo, não foi observado diferença estatística significativa ($p > 0,05$). A

administração de PVB incorporada em iogurte (HP) foi capaz de reduzir significativamente o ganho de peso quando comparado ao grupo HL a partir da 14ª semana e, embora o grupo HP apresentasse médias menores em relação ao grupo HI, esta diferença não foi significativa. O tratamento com metformina incorporado ao iogurte (HM) reduziu significativamente o ganho de peso corporal, de forma pontual na 10ª semana de tratamento e ao fim da 16ª semana, quando comparado ao grupo HL, não apresentando diferenças com o grupo HI. O tratamento combinado de PVB com metformina incorporados ao iogurte (HPM) reduziu o ganho de peso corporal dos animais ao fim do experimento (16ª semana) comparado ao grupo HL.

Na figura 7B, pode-se observar o ganho de peso corporal total dos animais após 16 semanas de oferta das dietas e os respectivos tratamentos, evidenciando a eficiência dos tratamentos com PVB, metformina e a combinação de ambos incorporados ao iogurte na redução de ganho de peso corporal em relação aos animais somente alimentados com a dieta hiperlipídica (grupo HL).

Figura 7 - (A) Evolução do peso corporal e (B) ganho de peso corporal total de camundongos alimentados com as dietas padrão ou hiperlipídica e tratados com própolis vermelha, metformina ou combinados, em iogurte, durante 8 semanas.

P: dieta padrão, gavados com água; PP: dieta padrão, tratados com PVB; HL: dieta hiperlipídica, gavados com água; HI: dieta hiperlipídica, tratados com iogurte; HP: dieta hiperlipídica, tratados com PVB + iogurte; HM: dieta hiperlipídica, tratados com metformina + iogurte; HPM: dieta hiperlipídica, tratados com PVB + metformina + iogurte. Anova One-Way (média $\pm$ erro padrão), $p < 0,05$ considerado como estatisticamente significativo. a, diferenças com P; b, diferenças com PP; c, diferenças com HL.



Fonte: autor (2024).

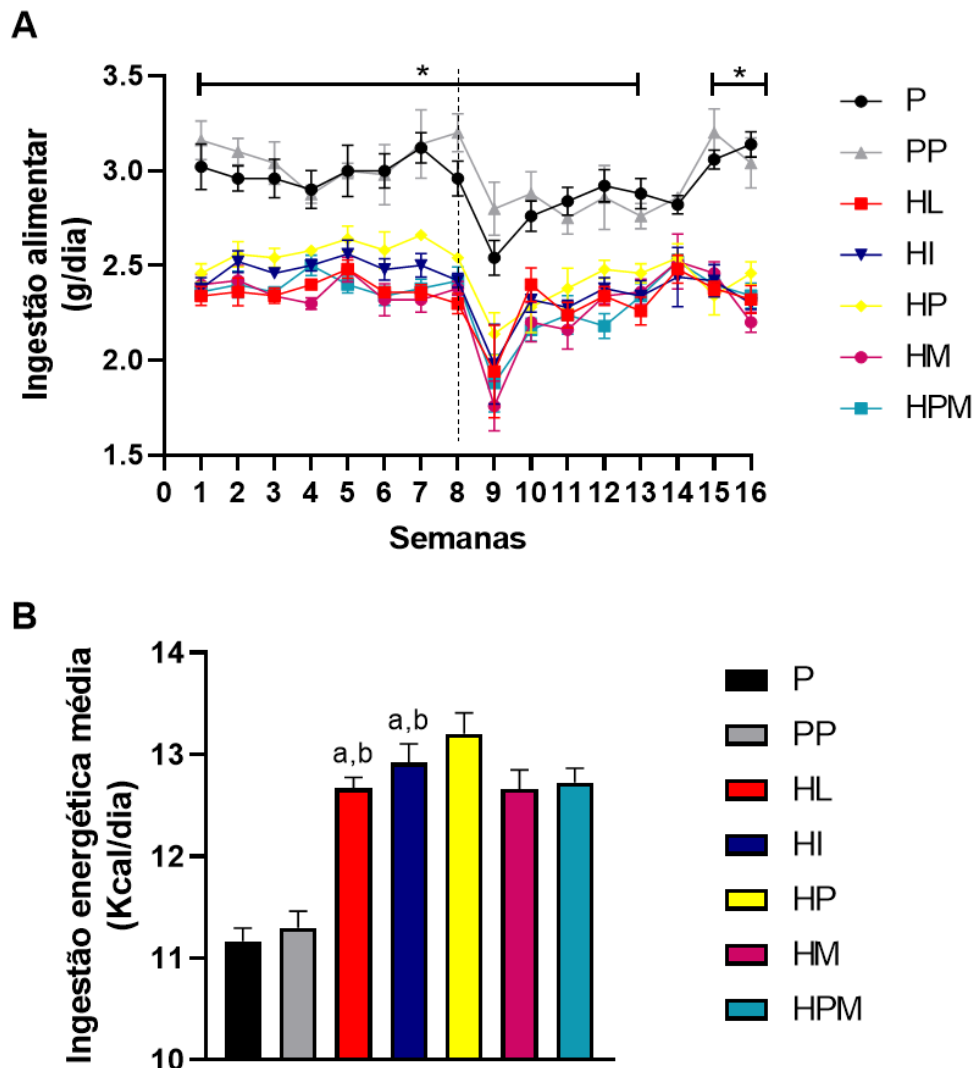
5.2.2. Ingestão alimentar e energética

Na Figura 8 estão apresentados os valores de ingestão alimentar e de ingestão energética dos camundongos submetidos às dietas padrão (P) e hiperlipídica (H). Todos os animais alimentados com a dieta H (grupos HL, HI, HP, HM e HPM) apresentaram uma menor ingestão alimentar (g/dia) em comparação aos animais alimentados com dieta P, normolipídica (grupos P e PP) (Figura 8A). Após o período de 8 semanas foi iniciado os protocolos de tratamento dos grupos, sendo necessário realizar a contenção física dos animais, subsecutivo ao estímulo estressor, observa-se uma diminuição da ingestão alimentar no tempo de 9 semanas em todos os grupos, normalizando estes valores nas semanas subsequentes. Os valores médios encontrados para a 14^a semana foi o único momento em que não houve diferenças significativas entre os grupos que consumiram dieta padrão e hiperlipídica. O que novamente pode ser observado possíveis interferências de estímulos estressores, como a punção caudal dos animais para a realização dos testes de TTGO e ITT neste período.

Apesar dos animais alimentados com dieta H apresentarem os menores valores médios de ingestão alimentar, ao longo das 16 semanas de experimento, devido a maior quantidade de calorias na composição da dieta hiperlipídica (5,40 Kcal/g) em comparação à dieta normolipídica, P (3,85 Kcal/g), os animais dos grupos HL, HI, HP, HM e HPM apresentaram maior ingestão energética, em relação aos animais dos grupos P e PP (Figura 8B).

Figura 8 - (A) Ingestão alimentar (g/dia) e (B) ingestão energética (Kcal/dia) de camundongos alimentados com as dietas padrão ou hiperlipídica e tratados com própolis vermelha, metformina ou combinados, em iogurte, durante 8 semanas.

P: dieta padrão, gavados com água; PP: dieta padrão, tratados com PVB; HL: dieta hiperlipídica, gavados com água; HI: dieta hiperlipídica, tratados com iogurte; HP: dieta hiperlipídica, tratados com PVB + iogurte; HM: dieta hiperlipídica, tratados com metformina + iogurte; HPM: dieta hiperlipídica, tratados com PVB + metformina + iogurte. Anova One-Way (média $\pm$ erro padrão), $p < 0,05$ considerado como estatisticamente significativo. *, diferenças entre grupos com dieta P e dieta H; a, diferenças com P; b, diferenças com PP.



Fonte: autor (2024).

5.2.3. Massas de tecidos adiposo, fígado, rim, coração e músculos *gastrocnemius*

Após a eutanásia dos animais, os seguintes tecidos foram coletados e suas massas determinadas (peso do tecido corrigidos por comprimento em milímetros da tíbia do animal): tecido adiposo branco epididimal (TAB epididimal), tecido adiposo branco retroperitoneal (TAB retroperitoneal), tecido adiposo marrom interescapular (TAM), fígado, rim, coração e músculos *gastrocnemius*.

Corroborando com os dados encontrados do ganho de peso corporal, os animais do grupo HL apresentaram aumento na massa dos tecidos adiposos brancos epididimal e retroperitoneal e do tecido adiposo marrom interescapular, quando comparado aos grupos P e PP (Tabela 4). Os tratamentos com iogurte (HI) e PVB incorporada em iogurte (HP), mostraram capacidade em reduzir a massa dos tecidos adiposos brancos epididimal e retroperitoneal, comparado ao grupo HL. Enquanto que os tratamentos com metformina apenas (HM) e em combinação com PVB, incorporados em iogurte (HPM) reduziram apenas a massa do tecido adiposo branco epididimal.

A massa dos rins foi outro parâmetro que apresentou aumento significativo nos grupos que consumiram dieta hiperlipídica quando comparados com os grupos P e PP, sendo que os tratamentos com iogurte (HI), PVB (HP), metformina (HM) e a combinação (HPM), não foram capazes de reduzir a massa do tecido renal.

Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos experimentais em relação às massas de fígado, coração e músculos esqueléticos *gastrocnemius* (Tabela 3).

Tabela 3 - Massas tecidos adiposos brancos (epididimal e retroperitoneal), tecido adiposo marrom interescapular, fígado, rins, coração e músculos *gastrocnemius* (mg / mm de tibia)

Grupos	P	PP	HL	HI	HP	HM	HPM
TAB epididimal (mg / mm tibia)	24,83 ± 2,69	23,9 ± 1,34	99,54 ± 7,31 (a,b)	65,60 ± 8,36 (c)	63,55 ± 8,48 (c)	66,03 ± 6,83 (c)	68,00 ± 7,55 (c)
TAB retroperitoneal (mg / mm tibia)	7,40 ± 1,02	7,512 ± 0,66	37,50 ± 2,38 (a,b)	25,83 ± 3,11 (c)	25,45 ± 2,53 (c)	32,31 ± 4,00	28,21 ± 3,12
TAM interescapular (mg / mm tibia)	3,14 ± 0,24	3,46 ± 0,34	5,90 ± 0,74 (a,b)	4,346 ± 0,42	4,343 ± 0,47	4,86 ± 0,58	4,84 ± 0,55
Fígado (mg / mm tibia)	58,27 ± 2,22	65,79 ± 2,67	66,03 ± 3,24	69,74 ± 5,84	68,2 ± 2,84	65,19 ± 3,18	70,34 ± 3,64
Rim (mg / mm tibia)	14,44 ± 0,32	15,87 ± 0,77	19,89 ± 0,61 (a,b)	21,06 ± 1,11 (a,b)	20,15 ± 0,63 (a,b)	19,40 ± 0,47 (a,b)	19,19 ± 0,58 (a,b)
Coração (mg / mm tibia)	7,01 ± 0,24	8,257 ± 0,58	8,35 ± 0,31	8,60 ± 0,46	8,749 ± 0,42	7,87 ± 0,30	8,72 ± 0,54
Gastrocnemius (mg / mm tibia)	16,97 ± 0,56	17,41 ± 0,40	16,77 ± 0,70	17,71 ± 0,90	17,96 ± 0,62	17,46 ± 0,49	17,28 ± 0,64

TAB: tecido adiposo branco; TAM: tecido adiposo marrom. P: dieta padrão, gavados com água; PP: dieta padrão, tratados com PVB; HL: dieta hiperlipídica, gavados com água; HI: dieta hiperlipídica, tratados com iogurte; HP: dieta hiperlipídica, tratados com PVB + iogurte; HM: dieta hiperlipídica, tratados com metformina + iogurte; HPM: dieta hiperlipídica, tratados com PVB + metformina + iogurte. Anova One-Way (média ± erro padrão), $p < 0,05$ considerado como estatisticamente significativo. a, diferenças com P; b, diferenças com PP; c, diferenças com HL.

5.3. Parâmetros bioquímicos de camundongos em modelo de obesidade e resistência à insulina

5.3.1. Testes de tolerância à glicose oral (TTGO) e de sensibilidade à insulina (ITT)

Para avaliar o impacto dos tratamentos incorporados ao iogurte na regulação dos níveis da glicemia e na sensibilidade dos tecidos à insulina, conduzimos dois testes: o teste de tolerância à glicose oral (TTGO) e o teste de tolerância à insulina (ITT), dos quais os resultados estão representados na figura 9.

A glicemia dos animais após jejum de 12h (tempo 0) apontou um aumento significativo nos níveis glicêmicos para o grupo HL comparado aos grupos P e PP. Os animais dos grupos HI, HP, HM e HPM não apresentaram diferenças

significativas na glicemia de jejum quando comparados ao grupo HL e também ao grupo que consumiu a dieta padrão (P).

Após o desafio com glicose (tempos 15, 30, 60, 90 e 120 minutos), os níveis glicêmicos dos animais que consumiram a dieta hiperlipídica e foram tratados apenas com água (HL) foram significativamente aumentados em comparação aos animais que consumiram a dieta padrão (P e PP); pode-se observar que mesmo após 120 minutos da sobrecarga oral de glicose, os níveis glicêmicos do grupo HL continuaram maiores em relação aos valores encontrados nos animais do grupo P e PP (Figura 9A).

Apesar de ser observado uma tendência ao aumento dos valores de glicemia nos animais tratados com o iogurte (HI) em estado de jejum, somente foi observado um aumento significativo dos níveis glicêmicos neste grupo 90 minutos após a sobrecarga de glicose, quando comparados aos grupos P e PP, mantendo essa diferença após 120 minutos.

O tratamento com PVB (HP) foi capaz de reduzir significativamente os níveis glicêmicos dos animais após 90 e 120 minutos da sobrecarga de glicose comparado com o grupo HL. Os tratamentos com metformina (HM) e a combinação de PVB + metformina (HPM) apresentaram níveis glicêmicos reduzidos após 15 minutos do desafio com a glicose comparados ao grupo HL, sendo observado essa redução significativa novamente nos tempos de 90 e 120 minutos, assim como o grupo HP.

Portanto, pode-se sugerir que a intolerância à glicose foi significativamente aumentada no grupo HL quando comparado aos grupos P e PP, onde observa-se um aumento na área sob a curva (AUC) (Figura 9B). Além disso, a AUC dos grupos HP, HM e HPM, foram diminuídas em relação a AUC do grupo HL, o que sugere uma diminuição da intolerância à glicose dos animais em dieta hiperlipídica.

Durante o ITT, antes e após aplicação da insulina (intraperitoneal), os níveis glicêmicos dos animais do grupo HL foram significativamente maiores em relação aos níveis glicêmicos dos animais que receberam somente a dieta padrão (P e PP), mostrando uma menor capacidade destes animais em reduzir a glicemia após o desafio com insulina, o que representa uma diminuição da sensibilidade à insulina nos animais do grupo HL (Figura 9C). Os animais que receberam dieta hiperlipídica e foram tratados com iogurte (HI) apresentaram níveis glicêmicos semelhantes ao grupo HL, 30 minutos após a administração de insulina, indicando que o iogurte

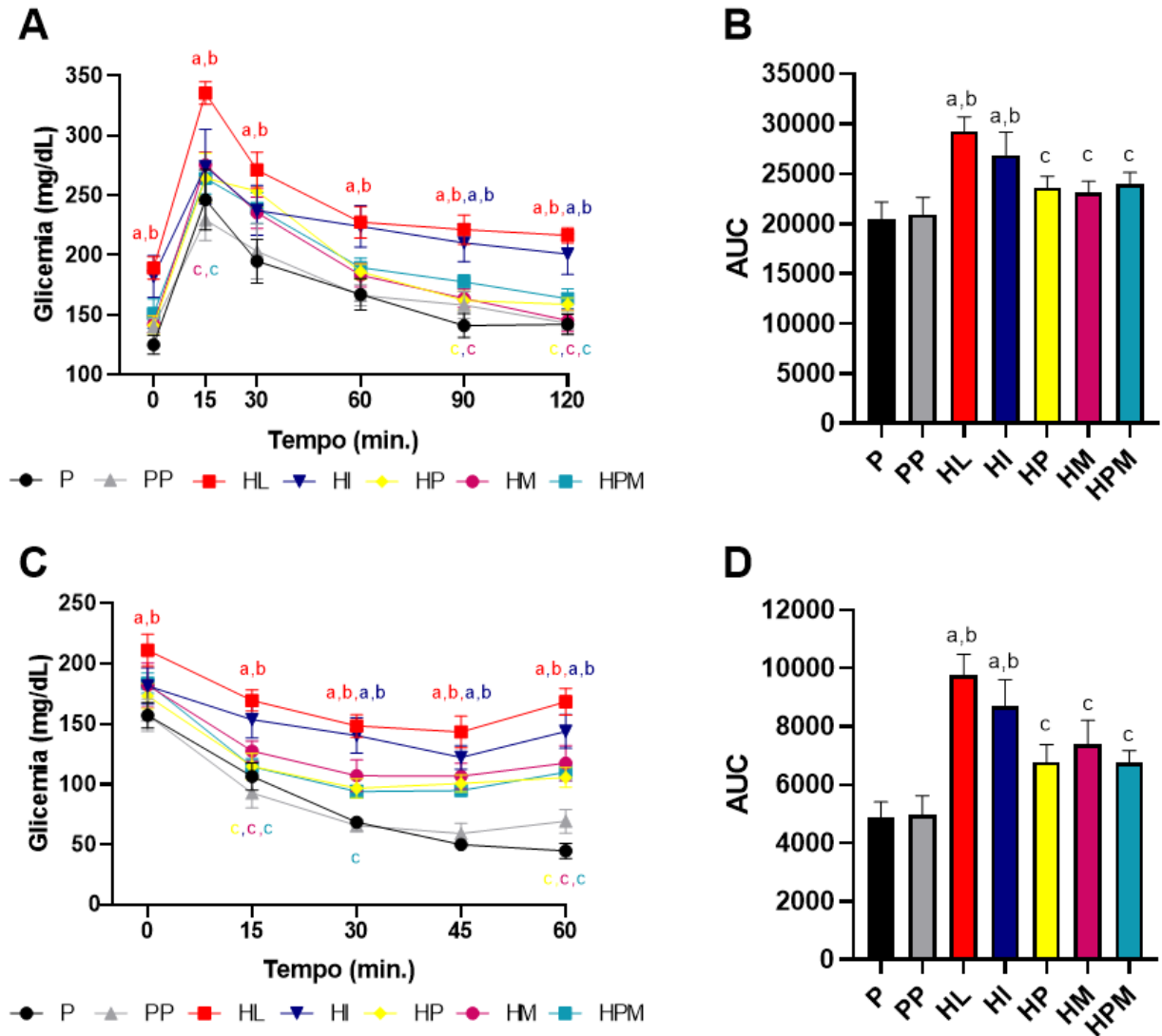
sozinho não é capaz de reverter completamente a resistência à insulina promovida pela dieta hiperlipídica.

Os animais tratados com PVB, metformina e a combinação (HP, HM e HPM) apresentaram redução nos valores de glicemia, em dois tempos de monitoramento no ITT (15 e 60 minutos), quando comparados aos animais do grupo HL, indicando melhorias significativas na responsividade dos animais frente ao desafio com insulina. É importante observar que o tratamento combinado de PVB e metformina (grupo HPM) manteve essa redução nos níveis glicêmicos dos animais também no tempo 30 minutos do ITT (Figura 9C).

Na Figura 9D, a AUC, contribui para observar a confirmação do modelo de obesidade e resistência à insulina nos grupos de animais que consumiram dieta hiperlipídica e corrobora o efeito benéfico dos tratamentos com PVB, metformina e os combinados incorporados ao iogurte (HP, HM e HPM) nos níveis glicêmicos frente ao desafio com insulina, indicando uma melhora na sensibilidade à insulina, em comparação aos grupos HL e HI.

Figura 9 - Acompanhamento da glicemia (mg/dL) de camundongos, durante: (A) teste de tolerância à glicose oral em 0, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos e (B) sua AUC; e o (C) teste de tolerância à insulina em 0, 15, 30, 45 e 60 minutos e (D) sua AUC.

P: dieta padrão, gavados com água; PP: dieta padrão, tratados com PVB; HL: dieta hiperlipídica, gavados com água; HI: dieta hiperlipídica, tratados com iogurte; HP: dieta hiperlipídica, tratados com PVB + iogurte; HM: dieta hiperlipídica, tratados com metformina + iogurte; HPM: dieta hiperlipídica, tratados com PVB + metformina + iogurte. Anova One-Way (média $\pm$ erro padrão), $p < 0,05$ considerado como estatisticamente significativo. a, diferenças com P; b, diferenças com PP; c, diferenças com HL.



Fonte: autor (2024).

5.3.2. Níveis plasmáticos de biomarcadores do metabolismo de carboidratos, lipídios e das disfunções hepática e renal

Na tabela 4 estão apresentados os níveis plasmáticos de glicemia, triacilgliceróis, colesterol total, colesterol-HDL, ureia, ácido úrico e das enzimas ALP, AST e ALT, de animais alimentados com dietas normolipídica ou hiperlipídica e

tratados com PV isoladamente ou em combinação com metformina ao final do experimento (16 semanas).

Os animais do grupo HL apresentaram aumento significativo da concentração plasmática de glicose, triacilgliceróis, colesterol total e colesterol-HDL (81,22%, 41,39%, 47,58% e 54,30%, respectivamente), quando comparados com os valores encontrados dos grupos de dieta padrão, P e PP. Os animais que consumiram apenas o iogurte como veículo (HI) apresentaram um aumento significativo nos parâmetros de glicemia (83,61%), colesterol total (36,6%) e colesterol-HDL (45,5%), mas não foram observadas diferenças significativas nos triacilgliceróis para este grupo, quando comparados aos grupos P e PP.

Os tratamentos com PVB (HP), metformina (HM) e a combinação (HPM) foram capazes de reduzir significativamente a concentração circulante destes componentes nos animais, quando comparados aos grupos HL e HI, não existindo diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de tratamentos e os grupos controle P e PP.

Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos para os biomarcadores: enzimas fosfatase alcalina (ALP), aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) que avaliam as disfunções hepáticas; como também de ureia e ácido úrico, utilizados para avaliar as disfunções renais.

Tabela 4 - Níveis dos parâmetros bioquímicos plasmáticos de camundongos alimentados com dieta P ou H e tratados por 8 semanas com PV isoladamente ou em combinação com metformina.

Grupos	P	PP	HL	HI	HP	HM	HPM
Glicemia (mg/dL)	142,2 ± 14,74	147,9 ± 8,66	257,7 ± 8,65 (a,b)	261,1 ± 7,86 (a,b)	151,2 ± 6,1 (c,d)	160,5 ± 5,5 (c,d)	158,5 ± 6,44 (c,d)
Triacilglicerol (mg/dL)	35,17 ± 2,9	35,69 ± 1,8	49,73 ± 2,33 (a,b)	44,15 ± 2,71	36,6 ± 2,27 (c)	36,33 ± 2,1 (c)	34,17 ± 1,66 (c)
Colesterol Total (mg/dL)	78,33 ± 4,0	79,08 ± 2,35	115,6 ± 3,7 (a,b)	107,0 ± 4,7 (a,b)	88,47 ± 2,0 (c,d)	89,73 ± 2,41 (c,d)	87,67 ± 2,12 (c,d)
Colesterol-HDL (mg/dL)	68,5 ± 4,25	68,77 ± 2,78	105,7 ± 3,0 (a,b)	99,67 ± 4,05 (a,b)	79,80 ± 3,1 (c,d)	82,27 ± 2,15 (c,d)	78,33 ± 2,32 (c,d)
ALP (U/L)	42,27 ± 0,92	41,23 ± 3,23	52,86 ± 1,88	50,27 ± 3,40	41,93 ± 1,96	41,60 ± 2,33	42,83 ± 2,04
AST (U/L)	102,6 ± 6,36	104,8 ± 6,17	113,2 ± 5,11	111,2 ± 9,16	105,9 ± 7,34	103,5 ± 5,94	102,2 ± 9,32
ALT (U/L)	27,58 ± 1,61	25,0 ± 1,65	29,13 ± 2,01	24,47 ± 1,57	26,8 ± 3,31	25,13 ± 2,30	23,92 ± 1,21
Ureia (mg/dL)	38,5 ± 2,90	38,7 ± 2,54	39,6 ± 0,96	37,39 ± 1,0	38,08 ± 0,87	37,25 ± 1,20	38,43 ± 1,90
Ácido Úrico (mg/dL)	0,66 ± 0,06	0,67 ± 0,05	0,85 ± 0,11	0,80 ± 0,06	0,66 ± 0,05	0,66 ± 0,07	0,70 ± 0,04

ALP: fosfatase alcalina; AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotransferase; P: dieta padrão, gavados com água; PP: dieta padrão, tratados com PVB; HL: dieta hiperlipídica, gavados com água; HI: dieta hiperlipídica, tratados com iogurte; HP: dieta hiperlipídica, tratados com PVB + iogurte; HM: dieta hiperlipídica, tratados com metformina + iogurte; HPM: dieta hiperlipídica, tratados com PVB + metformina + iogurte. Anova One-Way (média ± erro padrão), $p < 0,05$ considerado como estatisticamente significativo. a, diferenças com P; b, diferenças com PP; c, diferenças com HL; d, diferenças com HI.

5.4. Biomarcadores relacionados ao estresse glico-oxidativo e potencial antioxidante

5.4.1. Níveis plasmáticos

Na figura 10 (A e B) estão apresentados os resultados obtidos após análise dos parâmetros de peroxidação lipídica (TBARS) e de glicação avançada (AGE fluorescentes) no plasma.

Os animais dos grupos HL e HI apresentaram um aumento significativo dos valores médios de TBARS (25,8 e 25,0 $\mu\text{mol MDA/L}$, respectivamente), quando comparados com os valores encontrados dos grupos de dieta padrão, P e PP (15,8 e 16,7 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente) (Figura 10A). Os tratamentos com PVB (HP), metformina (HM) e a combinação (HPM) foram capazes de reduzir significativamente os valores circulantes de TBARS nos animais, quando comparados aos grupos HL e HI, com valores médios de 17,9, 18,0 e 17,5 ($\mu\text{mol/L}$), respectivamente.

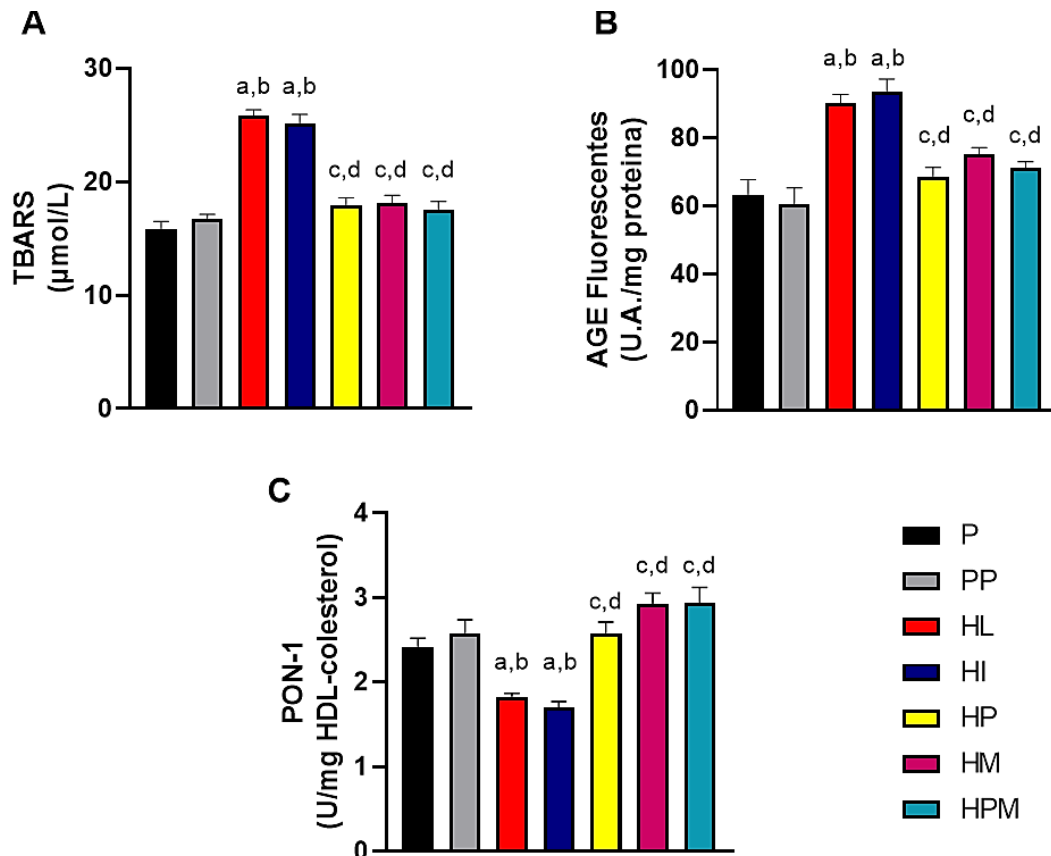
Os valores estimados no plasma de AGE fluorescentes para os grupos HL e HI (90,13 e 93,7 U.A./mg proteína), foram aumentados comparado aos grupos P e PP (63,0 e 60,5 U.A./mg proteína). E os tratamentos apresentaram redução dos valores estimados de AGE quando comparados aos grupos HL e HI; HP (68,6), HM (75,13) e HPM (71,23), de maneira semelhante ao ensaio de TBARS (Figura 10B).

Adicionalmente, na figura 10C podemos observar que os animais dos grupos HL e HI apresentaram, no plasma, redução significativa na atividade da enzima antioxidante paraoxonase 1 (PON-1), 24,8% e 30,2%, respectivamente, quando comparados com os grupos de dieta padrão P e PP. Contudo, os tratamentos conseguiram recuperar a atividade dessa enzima, elevando os valores a normalidade, quando comparados aos grupos HL e HI; HP (41,2%), HM (60,0%) e HPM (61,0%)

A conjunção, dos valores aumentados de TBARS e AGE fluorescentes com a redução do potencial antioxidante dos animais que consumiram dieta hiperlipídica, indica o estabelecimento do estresse glico-oxidativo nestes animais. Enquanto que os tratamentos isolado de PV ou em combinação com metformina, restaura o equilíbrio no plasma.

Figura 10 - Níveis plasmáticos de (A) TBARS ($\mu\text{mol/L}$), (B) AGE fluorescentes (U.A./mg proteína) e (C) atividade de PON-1 (U/mg HDL-colesterol).

P: dieta padrão, gavados com água; PP: dieta padrão, tratados com PVB; HL: dieta hiperlipídica, gavados com água; HI: dieta hiperlipídica, tratados com iogurte; HP: dieta hiperlipídica, tratados com PVB + iogurte; HM: dieta hiperlipídica, tratados com metformina + iogurte; HPM: dieta hiperlipídica, tratados com PVB + metformina + iogurte. Anova One-Way (média $\pm$ erro padrão), $p < 0,05$ considerado como estatisticamente significativo. a, diferenças com P; b, diferenças com PP; c, diferenças com HL; d, diferenças com HI.



Fonte: autor (2024).

5.4.2. Tecido hepático

Após a análise dos parâmetros de peroxidação lipídica (TBARS) e de glicação avançada (AGE fluorescentes), pode-se observar que o estresse glico-oxidativo foi estabelecido no fígado dos animais alimentados com dieta HL (Figura 11).

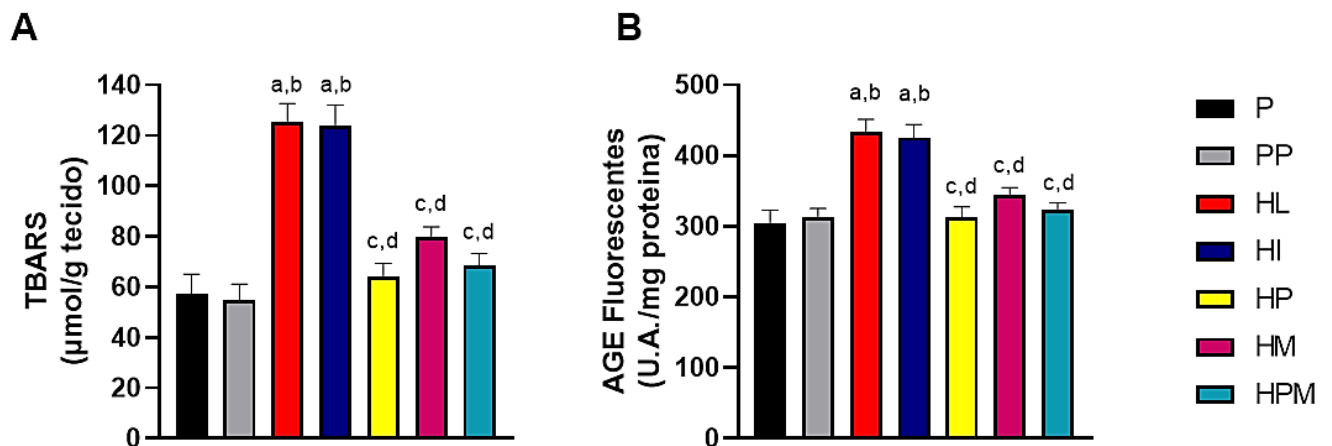
Os animais dos grupos HL e HI apresentaram um aumento significativo dos valores médios de TBARS (125,15 e 123,92 $\mu\text{mol/g}$ de tecido, respectivamente), quando comparados com os valores encontrados dos grupos de dieta padrão, P e PP (57,21 e 54,75 $\mu\text{mol/g}$ de tecido, respectivamente) (Figura 10A). Os tratamentos com PVB (HP), metformina (HM) e a combinação (HPM) foram capazes de reduzir significativamente os valores de TBARS no fígado dos animais, quando comparados

aos grupos HL e HI, com valores médios de 64,00, 79,78 e 68,66 ($\mu\text{mol/g}$ de tecido), respectivamente.

De modo semelhante, os valores estimados no fígado de AGE fluorescentes para os grupos HL e HI (433,36 e 425,77 U.A./mg proteína), foram aumentados comparado aos grupos P e PP (304,66 e 312,72 U.A./mg proteína). E os tratamentos apresentaram redução dos valores médios estimados de AGE quando comparados aos grupos HL e HI; HP (312,44), HM (344,10) e HPM (323,17) (Figura 11B).

Figura 11 - Níveis hepáticos de (A) TBARS ($\mu\text{mol/g}$ de tecido) e (B) AGE fluorescentes (U.A./mg proteína).

P: dieta padrão, gavados com água; PP: dieta padrão, tratados com PVB; HL: dieta hiperlipídica, gavados com água; HI: dieta hiperlipídica, tratados com iogurte; HP: dieta hiperlipídica, tratados com PVB + iogurte; HM: dieta hiperlipídica, tratados com metformina + iogurte; HPM: dieta hiperlipídica, tratados com PVB + metformina + iogurte. Anova One-Way (média $\pm$ erro padrão), $p < 0,05$ considerado como estatisticamente significativo. a, diferenças com P; b, diferenças com PP; c, diferenças com HL; d, diferenças com HI.



Fonte: autor (2024).

A figura 12 exibe os resultados relativos às atividades das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx no fígado.

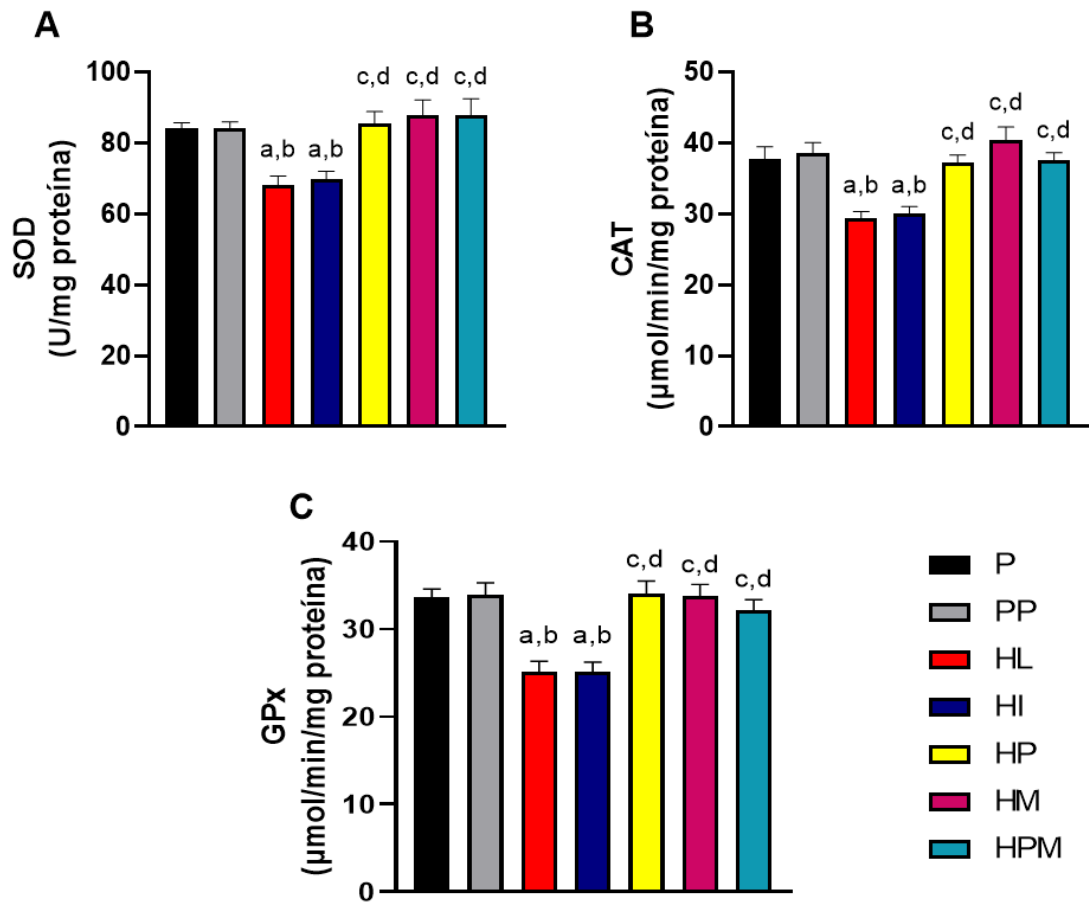
O grupo HL apresentou redução de 19% na atividade da SOD, quando comparado aos grupos P e PP. O tratamento de iogurte isoladamente (HI) não foi capaz de prevenir a redução na atividade de SOD encontrada nos animais que consumiram a dieta hiperlipídica. Os animais tratados com PVB (HP), metformina (HM) e a combinação (HPM) apresentaram aumento de 25%, 28% e 29%, respectivamente, na atividade da SOD, quando comparados aos grupos HL e HI (Figura 12A).

Na avaliação de atividade da CAT no fígado, os grupos HL e HI apresentaram redução significativa, 21% e 18%, respectivamente, em relação aos grupos P e PP. Os grupos HP, HM e HPM promoveram aumento na atividade da CAT, 29%, 37% e 27%, respectivamente, comparados aos grupos HL e HI (Figura 12B).

De modo semelhante, os valores de atividade da GPx nos grupos HL e HI, reduziram significativamente (24%), em comparação aos grupos P e PP. Enquanto que os tratamentos (HP, HM e HPM), recuperaram os valores de atividade da enzima, com aumento de 36%, 35% e 28%, respectivamente (Figura 12C).

É interessante observar que os tratamentos com PVB, metformina e a combinação de ambos, incorporados ao iogurte, foram capazes de prevenir a perda da atividade de todas as enzimas antioxidantes no fígado de animais em modelo de obesidade e resistência insulínica.

Figura 12 - Atividade das enzimas antioxidantes hepáticas (A) superóxido dismutase (SOD); (B) catalase (CAT); (C) glutathiona peroxidase (GPx). P: dieta padrão, gavados com água; PP: dieta padrão, tratados com PVB; HL: dieta hiperlipídica, gavados com água; HI: dieta hiperlipídica, tratados com iogurte; HP: dieta hiperlipídica, tratados com PVB + iogurte; HM: dieta hiperlipídica, tratados com metformina + iogurte; HPM: dieta hiperlipídica, tratados com PVB + metformina + iogurte. Anova One-Way (média $\pm$ erro padrão), $p < 0,05$ considerado como estatisticamente significativo. a, diferenças com P; b, diferenças com PP; c, diferenças com HL; d, diferenças com HI.



Fonte: autor (2024).

5.4.3. Tecido renal

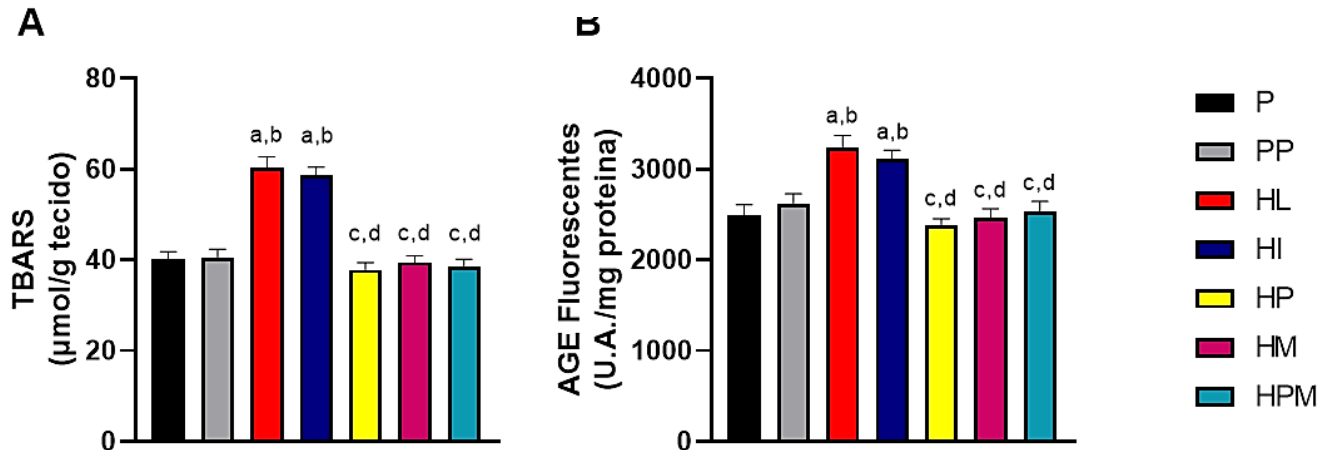
Assim, como na análise do tecido hepático, os níveis de TBARS e AGE fluorescentes encontrados nos rins de animais alimentados com a dieta hiperlipídica, aumentou significativamente, evidenciando o estabelecimento do quadro de estresse glico-oxidativo neste tecido (Figura 13).

Nos grupos HL e HI, observou-se um aumento significativo nos valores médios de TBARS (60,30 e 58,61 $\mu\text{mol/g}$ de tecido, respectivamente), em comparação com os valores encontrados nos grupos de dieta padrão, P e PP (40,15 e 40,38 $\mu\text{mol/g}$ de tecido, respectivamente) (Figura 13A). Os tratamentos com PVB (HP), metformina (HM) e a combinação dos dois (HPM) demonstraram capacidade de reduzir os níveis de TBARS no rim dos animais quando comparados aos grupos HL e HI, apresentando valores médios de 37,80, 39,50 e 38,60 ($\mu\text{mol/g}$ de tecido), respectivamente.

A quantificação de AGE fluorescentes no rim dos grupos HL e HI indicou valores estimados mais elevados (762,84 e 731,99 U.A./mg de proteína) em comparação com os grupos P e PP (586,78 e 615,72 U.A./mg de proteína). Os tratamentos também resultaram em uma redução significativa nos valores médios estimados de AGE quando comparados aos grupos HL e HI: HP (561,15), HM (579,90) e HPM (594,85), como evidenciado na figura 13B.

Figura 13 - Níveis renais de (A) TBARS ($\mu\text{mol/g}$ de tecido) e (B) AGE fluorescentes (U.A./mg proteína).

P: dieta padrão, gavados com água; PP: dieta padrão, tratados com PVB; HL: dieta hiperlipídica, gavados com água; HI: dieta hiperlipídica, tratados com iogurte; HP: dieta hiperlipídica, tratados com PVB + iogurte; HM: dieta hiperlipídica, tratados com metformina + iogurte; HPM: dieta hiperlipídica, tratados com PVB + metformina + iogurte. Anova One-Way (média $\pm$ erro padrão), $p < 0,05$ considerado como estatisticamente significativo. a, diferenças com P; b, diferenças com PP; c, diferenças com HL; d, diferenças com HI.



Fonte: autor (2024).

A figura 14 exibe os resultados relativos às atividades das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx no rim.

Houve uma significativa redução (49%) na atividade da SOD nos rins de animais que consumiram a dieta hiperlipídica, quando comparados aos grupos que consumiram a dieta padrão (P e PP), sendo que, nenhum dos tratamentos utilizados (HI, HP, HM e HPM) conseguiu reverter ou amenizar a diminuição de atividade da SOD (Figura 14A).

Na avaliação de atividade da CAT nos rins, os grupos HL e HI apresentaram redução de 20%, em relação aos grupos P e PP. O tratamento com PVB (HP) foi capaz de aumentar a atividade da enzima em 28%, comparado aos grupos HL e HI. O tratamento com o fármaco metformina (HM), não apresentou diferença significativa dos grupos HL e HI, quanto a atividade da CAT presente no tecido renal. No entanto, o tratamento combinado de metformina com PVB, resultou no aumento (21%) de atividade da CAT (Figura 14B).

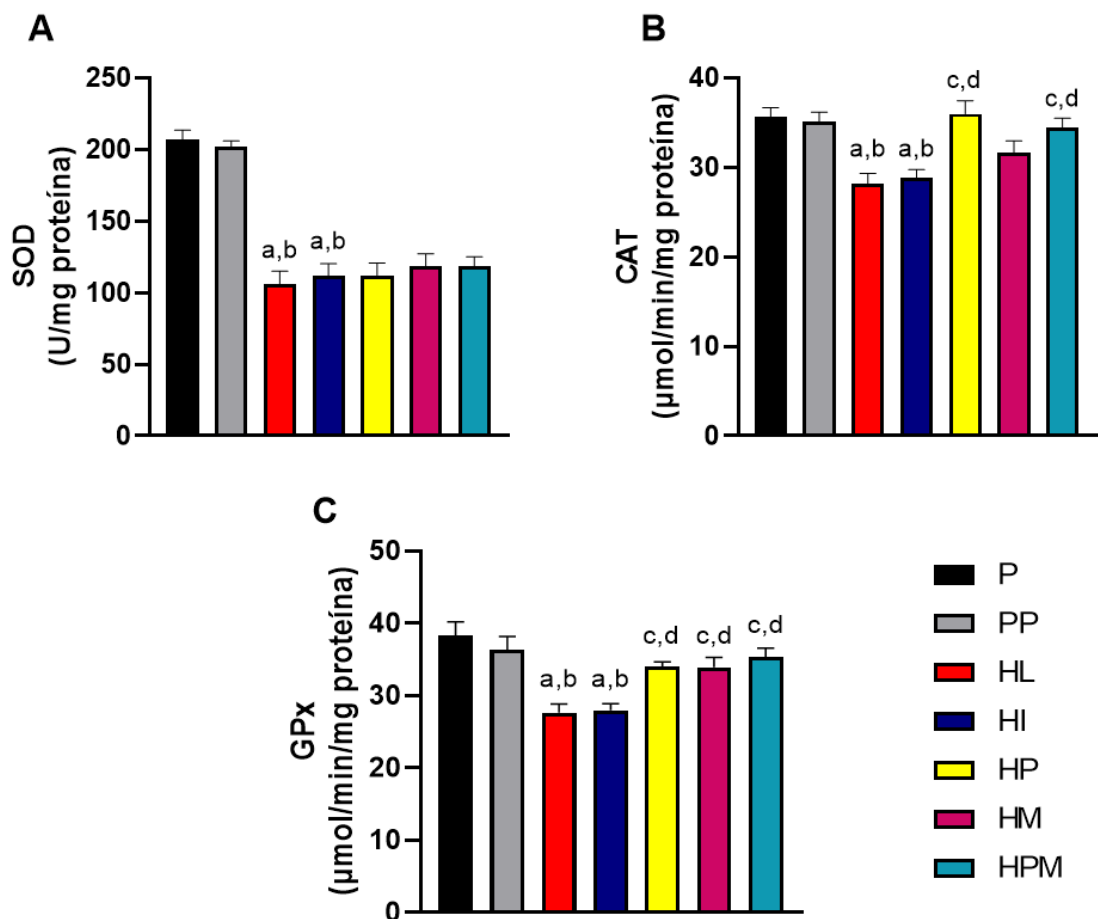
Os valores de atividade da GPx nos grupos HL e HI, reduziram significativamente (29%), em comparação aos grupos P e PP. Enquanto que os tratamentos (HP, HM e HPM), recuperaram os valores de atividade da enzima, com

aumento de 26%, 26% e 30%, respectivamente, comparados aos grupos HL e HI (Figura 14C).

Apesar de os tratamentos utilizados em nosso estudo não recuperarem os níveis de atividade da SOD nos rins de animais em modelo de obesidade e resistência à insulina, os tratamentos com PVB, metformina e a combinação de ambos incorporados ao iogurte, foram capazes de prevenir a perda de atividade da CAT e GPx no tecido renal.

Figura 14 - Atividade das enzimas antioxidantes renais (A) superóxido dismutase (SOD); (B) catalase (CAT); (C) glutathiona peroxidase (GPx).

P: dieta padrão, gavados com água; PP: dieta padrão, tratados com PVB; HL: dieta hiperlipídica, gavados com água; HI: dieta hiperlipídica, tratados com iogurte; HP: dieta hiperlipídica, tratados com PVB + iogurte; HM: dieta hiperlipídica, tratados com metformina + iogurte; HPM: dieta hiperlipídica, tratados com PVB + metformina + iogurte. Anova One-Way (média $\pm$ erro padrão), $p < 0,05$ considerado como estatisticamente significativo. a, diferenças com P; b, diferenças com PP; c, diferenças com HL; d, diferenças com HI.



Fonte: autor (2024).

6. Discussão

Em geral, a composição química da própolis depende da biodiversidade e a posição fitogeográfica das colmeias, com vários fatores que desempenham um papel em sua composição: sazonalidade, luminosidade, altitude, flora e tipo de abelha coletora (Castro et al., 2007; Kumazawa; Hamasaka; Nakayama, 2004). Vários compostos distintos foram identificados no extrato hidro-etanólico de PVB (Tabela 1), incluindo isoflavonóides, pterocarpanos, chalconas, flavonóides, benzofenonas, terpenos e taninos, sendo achados semelhantes aos de Vieira de Moraes e colaboradores (2021) que utilizaram amostras de própolis obtidas da mesma região e período deste trabalho.

Outro fator de grande relevância é o procedimento inicial para extração de polifenóis de um produto natural, considerando a escolha de condições de extração apropriadas, como: proporção amostra-solvente, concentração de solvente, temperatura e tempo de extração, pois estas podem afetar a composição final do extrato e a bioatividade (Abd El-Salam; Morsy, 2019). Considerando estes fatores, em nosso estudo utilizamos o método de extração com condições otimizadas para recuperação de compostos antioxidantes de PVB: etanol/água 90% (v/v), banho-maria a 80°C, por 30 min e posteriormente submetida à filtração a vácuo para obtenção do seu extrato hidro-etanólico (Vieira de Moraes et al., 2021).

Entre todos os compostos encontrados por meio de LC-ESI-QTOF-MS/MS em nosso extrato, ganham destaque os isoflavonóides, representados por formononetina, biochanina A, pinocembrina, medicarpin, vestitol e neovestitol, muitas vezes descritos como os marcadores químicos principais da PVB (Bueno-Silva et al., 2017; Lopez et al., 2015; Trusheva et al., 2006). Os flavonoides são uma subclasse de polifenóis, que compreendem um amplo grupo de substâncias naturais não sintetizadas pelos animais e amplamente distribuídos nas plantas (Beecher, 2003; Manach et al., 2004) e são a principal classe de compostos fenólicos em vários produtos naturais (PANCHE, 2016). Vários estudos revelaram os efeitos benéficos dos flavonoides extraídos de própolis em doenças humanas (WATANABE, 2011).

Cabral e colaboradores (2009) avaliaram a atividade antioxidante *in vitro* do extrato etanólico de PVB (EEPV) através do sistema β -caroteno/ácido linoleico que consiste na capacidade de uma amostra ou composto em proteger um substrato lipídico, monitorada pela oxidação do β -caroteno, e determinada por meio da

atividade de inibição do radical peroxil gerado durante a peroxidação do ácido linoleico, com o EEPV alcançando 61,26% de atividade. Este estudo, indica que há uma correlação positiva entre os compostos fenólicos presentes no EEPV e a atividade antioxidante pela lipoperoxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico (Cabral et al., 2009), semelhante ao modelo utilizado em nosso estudo de β -caroteno/AAPH, demonstrando uma importante função antioxidante por meio da captura de radicais livres.

Oldoni e colaboradores (2011) isolaram e identificaram em amostras, dois isoflavonóides (vestitol e neovestitol) e uma chalcona (isoliquiritigenina), e utilizando o método β -caroteno/ácido linoleico, foi possível observar uma potente ação antioxidante, para o extrato etanólico e seus compostos, com destaque ao vestitol (39,5% de atividade). Neste contexto, estes compostos também exercem efeito antioxidante na produção de outras espécies reativas, como o óxido nítrico. Bueno-Silva e colaboradores (2013a), observaram que estes isoflavonóides são capazes de reduzir o processo inflamatório em camundongos inibindo a produção de óxido nítrico e a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal após aplicação destes componentes. Este resultado sugere que a ação antioxidante do PVB sobre os radicais livres, também pode ser observada em modelos *in vivo*.

Partindo dessa premissa, considerou-se avaliar os efeitos da PVB com camundongos C57BL/6, em modelo de obesidade e resistência à insulina induzido por alimentação de dieta hiperlipídica. Os camundongos *High-Fat Diet* (HFD) provaram ser inestimáveis não apenas para a identificação de vias moleculares afetadas pela diabetes mellitus, mas também em protocolos pré-clínicos para testar terapias potenciais para reverter a condição e seus processos fisiopatológicos associados, via biomarcadores do estresse glico-oxidativo, lipoperoxidação e alterações fisiometabólicas neste modelo (Heydemann, 2016).

Os primeiros parâmetros avaliados com o estabelecimento do modelo foram a evolução do peso corporal, a ingestão alimentar e a massa de determinados tecidos dos animais. Considerando os resultados obtidos, fica claro ser a dieta hiperlipídica responsável pelo aumento de peso corporal dos animais devido ao aumento da massa de tecidos adiposos branco (epididimal e retroperitoneal) e marrom (interescapular), apesar de sua ingestão alimentar ser menor, o consumo energético fornecido pela dieta H é superior ao encontrado em dietas normolipídicas, garantindo o estabelecimento do quadro de obesidade durante as 16 semanas de experimento.

A administração de iogurte (grupo HI) exerceu efeitos modestos sobre os animais obesos, atenuando apenas o ganho de peso, no entanto, os níveis glicêmicos, massa dos tecidos e a ação antioxidante, não foram alterados por este produto. Resultados anteriores em nosso grupo de pesquisa, mostraram que a administração oral de compostos bioativos em iogurte resolve a restrição de bioativos com baixa solubilidade em água destes produtos, sem exercer efeitos mais potentes sobre os parâmetros analisados (Assis et al., 2017; Figueiredo et al., 2020; Gutierrez et al., 2019; Roxo et al., 2019). Além disso, a administração de fitoquímicos no iogurte não prejudicou os seus benefícios contra os sintomas diabéticos e por estas razões, o iogurte tem sido considerado um veículo importante para fitoquímicos (Assis et al., 2017; Costa et al., 2020; Figueiredo et al., 2020, 2024; Gutierrez et al., 2019; Roxo et al., 2019).

Contudo, os diferentes tratamentos incorporados ao iogurte, PVB (100 mg/kg animal), metformina (50 mg/kg animal) e a combinação (PVB 100 mg/kg + metformina 50 mg/kg), demonstraram potencial em prevenir e amenizar o ganho de peso, sem alterar as taxas de ingestão alimentar e energética da dieta, demonstrando potencial anti-obesogênico desses compostos.

São escassos na literatura os estudos que relacionam o consumo de PVB com o peso corporal dos animais modelo utilizados. Entretanto, um trabalho realizado por Morsy e colaboradores (2013), observou a relação do peso e escore corporal de ovelhas com a PVB como aditivo na alimentação, e o aditivo não alterou o peso corporal dos animais. Outro trabalho que utilizou duas outras variedades de própolis brasileira (verde e marrom) como aditivo na alimentação de bezerros, demonstrou que o peso corporal também não é alterado (Ítavo et al., 2011).

Em contrapartida, um estudo utilizando modelo de diabetes em ratas gestantes, apontou a aplicabilidade da própolis (derivado da Malásia) em reverter a perda de peso dos animais diabéticos, além de reduzir os níveis de glicemia e marcadores de estresse oxidativo (Usman; Bakar; Mohamed, 2018). Assim, como relatado por Koya-Miyata e colaboradores (2009) no estudo com própolis brasileira, há reduções significativas no ganho de peso de camundongos C57BL/6 alimentados com dieta hiperlipídica. Nesse sentido, por enquanto podemos observar que nestas variedades de própolis há prevenção a perda de peso nos animais quando estão sujeitos à algum tipo de *stress* (ambiental ou congênito), mas em estado hígido (normais), o parâmetro de peso corporal não sofre alterações pelo consumo de

própolis, neste caso a própolis vermelha (Da Costa et al., 2015; Teles et al., 2015). Essa hipótese é também sustentada pelos resultados que encontramos no grupo HP (consumiu dieta H e tratado com PVB em iogurte) quando comparamos com o grupo PP (consumiu dieta P e tratado com PVB em iogurte), que não sofreu alterações no ganho de peso ou ingestão alimentar.

A própolis parece ter efeitos reguladores sobre o tecido adiposo em animais obesos, mas esses efeitos podem variar de acordo com o tipo de tecido adiposo e a dose de própolis utilizada nos ensaios, sendo o tecido adiposo visceral mais sensível à própolis em comparação com o tecido adiposo subcutâneo (epididimal e retroperitoneal) (Ichi et al., 2009; Koya-Miyata et al., 2009).

Nossos resultados mostram que a PVB foi capaz de reduzir a massa dos tecidos adiposos brancos subcutâneos, provavelmente, devido a sua ação em melhorar a diferenciação de células precursoras de adipócitos (3T3-L1), através da ativação do PPAR- γ (receptor ativado por proliferador de peroxissomas γ), um regulador importante da diferenciação de adipócitos e está associado à indução de genes críticos para a adipogênese, incluindo adiponectina (Iio et al., 2010). A ativação do PPAR- γ aumenta o número de pequenos adipócitos que expressam adiponectina e, ao mesmo tempo, reduz o número de adipócitos maiores que produzem quantidades excessivas de TNF- α e ácidos graxos livres, melhorando assim a resistência à insulina, como observado em modelos de ratos obesos tratados com troglitazone (droga antidiabética) (Okuno et al., 1998).

O fármaco metformina é o tratamento de primeira escolha nos quadros de DM tipo 2, reduzindo o ganho de peso corporal em modelos de obesidade, apresentando ação anorexígena, devido a interações diretas do fármaco com as vias de sinalização dos adipócitos e sua função endócrina, inibindo a secreção de leptina no tecido adiposo marrom, demonstrada em modelos animais experimentais (Klein et al., 2004). Por promover a ativação da enzima AMPK (proteína quinase ativada por AMP), a metformina tem a capacidade de elevar a expressão de proteínas desacopladoras (UCP, do inglês uncoupling protein), associadas à termogênese, acelerando a oxidação dos ácidos graxos, o que contribui para a redução das massas dos tecidos adiposos (Tokubuchi et al., 2017).

A incorporação da metformina em iogurte comercial não impediu seu efeito anti-obesogênico no modelo utilizado e a combinação entre o fármaco e a PVB (grupo HPM), apesar de não resultar em efeitos aditivos ou sinérgicos na redução de

ganho de peso, ingestão alimentar e massa dos tecidos adiposos, foi efetivo no controle desses parâmetros nos mesmos níveis dos tratamentos isolados, como já foi observado em outros estudos de nosso grupo de pesquisa que utilizaram a combinação deste fármaco com bioativos naturais (Figueiredo et al., 2020; Motta et al., 2022).

O aumento do tecido adiposo observado em camundongos obesos está correlacionado com um acúmulo excessivo de lipídios (oriundos da dieta) que gera estresse nas células de gordura, os adipócitos (Vegiopoulos; Rohm; Herzig, 2017). Por sua vez, o acúmulo de gordura é responsável por diversos efeitos adversos da obesidade, tais como: modificações na liberação de fatores associados a distúrbios metabólicos, incluindo o TNF- α , IL-6, resistina, leptina e adipocinas; além de uma resposta inflamatória de baixa intensidade, que, em última instância, leva ao desenvolvimento de disfunções metabólicas, como a deterioração da sensibilidade à insulina e a intolerância à glicose (Vegiopoulos; Rohm; Herzig, 2017).

A própolis parece ter propriedades benéficas na regulação dos níveis de glicose no sangue e lipídios em diversos estudos com modelos de DM tipo 2 (Kitamura, 2019). No entanto, é importante notar que os mecanismos precisos e os efeitos podem variar dependendo do tipo de própolis e das condições experimentais. Em nosso estudo, observamos que a PVB isolada ou em combinação com metformina foi capaz de reduzir os níveis glicêmicos e melhorar a sensibilidade à insulina nos testes de TTGO e ITT, recuperar os valores de normalidade da glicemia plasmática ao final do experimento (16 semanas) e reduzir a dislipidemia dos animais ao restabelecer os valores de triacilgliceróis, colesterol total e da lipoproteína de alta densidade (HDL-colesterol).

Até o momento, os dados existentes sugerem que o impacto da PVB sobre a glicemia de animais obesos pode ser consequência da sua capacidade de atenuar o processo inflamatório de baixa intensidade estabelecido neste modelo. Já é conhecido, que a administração de PVB e dois isoflavonóides encontrados neste tipo de própolis (vestitol e neovestitol) modificam a sinalização em macrófagos derivados de monócitos, quando expostos ao lipopolissacarídeo (LPS), resultando na redução da produção de mediadores pró-inflamatórios, como IL-1 e IL-12, interferindo na resposta dos receptores Toll-like (TLR), inibindo as vias de sinalização de NF- κ B, MAPK e fosfoinositídeo-3-quinase (PI3K), e regulando de maneira distinta a

expressão de vários genes envolvidos no processo inflamatório (Bueno-Silva et al., 2015).

Todavia, existem outras possibilidades para explicar esse efeito hipoglicemiante da própolis de origem brasileira, onde destacam-se: a melhora na captação de glicose pelas células, facilitada pela translocação de GLUT4 para a membrana plasmática nas células musculares, através das vias de sinalização da AMPK e da PI3K, o que influencia positivamente a absorção de glicose pelas células (Ueda; Hayashibara; Ashida, 2013); e a capacidade de inibir a gliconeogênese nos hepatócitos, reduzindo a atividade da enzima glicose-6-fosfatase (G6Pase), inibindo a auto fosforilação dos resíduos de serina e tirosina da enzima quinase 3 da síntese de glicogênio (GSK3), resultando na redução da produção de glicose a partir de fontes não glicídicas (Kang et al., 2010). Concomitantemente, a expressão dos genes relacionados à lipogênese depende da proteína SREBP-1c (fator de transcrição *sterol regulatory element binding protein-1c*), cuja atividade é estimulada pela insulina e inibida pela AMPK, que uma vez ativada, suprime enzimas essenciais na síntese de ácidos graxos, ocasionando efeitos anti-hiperlipidêmicos (Van Stee; De Graaf; Groen, 2018).

Além dos efeitos listados acima, diferentes tipos de própolis potencializam a secreção de insulina das células β e também melhoram a sensibilidade à insulina ao modular a sinalização do receptor de insulina (IR) / Akt / mTOR (alvo de rapamicina em mamíferos) (Kitamura, 2019). Este efeito está relacionado com a ação de compostos, como galangina e pinocembrina aumentando a atividade da hexoquinase e piruvato quinase em células hepáticas (Liu et al., 2018), sendo a pinocembrina um dos principais constituintes da PVB.

No estudo de Batista e colaboradores (2012) foi observado que o extrato hidroetanólico de PVB induziu a redução do colesterol total, triacilgliceróis e glicose, de modo semelhante ao nosso estudo, correlacionando os resultados encontrados com o efeito antioxidante dos flavonoides presentes nos extratos. Sendo assim, os resultados até o momento indicam que a ação antioxidante da PVB é uma das principais vias envolvidas na atenuação das complicações da obesidade e resistência à insulina.

De maneira já esperada, a metformina foi capaz de melhorar o quadro de hiperglicemia, hiperinsulinemia e dislipidemia estabelecidos em nosso modelo.

Assim, como no estudo de Matsui e colaboradores (2010), é descrito que o tratamento com metformina durante 9 semanas em camundongos submetidos a dieta hiperlipídica, também alcançaram esses resultados devido a redução do peso corporal e menor deposição de gordura. Adicionalmente, no trabalho de Roxo e colaboradores (2019), foi observado uma diminuição nos níveis plasmáticos de triglicerídeos e colesterol ao tratarem ratos diabéticos (induzidos com STZ) com 250 mg/kg de metformina em iogurte no período de 30 dias, quando comparados com os animais diabéticos tratados apenas com iogurte.

A ação da metformina sobre a dislipidemia ocorre por meio de diferentes processos, como a redução da síntese de lipoproteínas e os níveis de glicose hepática (impedindo que esse substrato alimente a lipogênese) e elevando a secreção de GLP-1, o que leva à inibição da lipase gástrica e reduz a absorção de lipídios (Van Stee; De Graaf; Groen, 2018). Tais processos também promovem a diminuição das apolipoproteínas apo B-48 e apo A-IV, o que reduz a produção e o transporte de triacilgliceróis. E ao modular a AMPK, a metformina interfere também na síntese de colesterol e triglicerídeos, inibindo os processos enzimáticos envolvidos, explicando suas propriedades anti-hiperlipidêmicas (Van Stee; De Graaf; Groen, 2018).

De forma semelhante, o efeito combinado de metformina com PVB, conseguiu reduzir os níveis glicêmicos, sem ocasionar a hipoglicemia desses animais, conforme observado nos ensaios de desafios com glicose e insulina. Essa é uma observação especial que deve ser mencionada, pois quando um fármaco com ação anti-hiperglicemiante e um produto natural que demonstra o mesmo potencial de atividade são combinados, seus efeitos podem ser severos (Prabhakar; Kumar; Doble, 2014), o que não foi observado em nosso estudo, agregando segurança na utilização da PVB como adjuvante no tratamento de pacientes com DM tipo 2.

A hiperglicemia prolongada associada as condições de estresse glicoxidativo, causam glicação de proteínas e amino lipídios por reações independentes de enzimas, levando à geração de AGE (Volpe et al., 2018). Adicionalmente, a oxidação de ácidos graxos poli-insaturados por ERO, resulta na formação de produtos como malondialdeído (MDA, quantificado por TBARS) (Ott et al., 2014; Vistoli et al., 2013). Sendo assim, o efeito anti-hiperglicêmico observado nos tratamentos com PVB e metformina contribuíram para a diminuição dos níveis de TBARS e AGE

fluorescentes circulantes no plasma e também nos tecidos hepático e renal de animais em nosso modelo, comparativamente aos animais que consumiram a dieta hiperlipídica, mas não receberam nenhum tipo de tratamento e assim passíveis do estresse glico-oxidativo.

No estudo de Boeing e colaboradores (2021), foi demonstrado o efeito gastroprotetor de PVB no modelo de úlceras gástricas em roedores, através da redução do estresse oxidativo, com aumento nos níveis de GSH e diminuição de hidroperóxidos lipídicos (LOOH), marcando uma menor peroxidação de componentes da membrana celular. E em outros estudos, foram relatados níveis mais baixos de MDA no rim, fígado e plasma em diferentes modelos pré-clínicos de inflamação e estresse oxidativo com aplicação oral de PVB (Barbosa Bezerra et al., 2017; Da Costa et al., 2015; Teles et al., 2015).

O extrato etanólico de PVB, demonstrou em estudos *in vitro* e *in vivo*, a capacidade de ativar a via antioxidante intracelular Nrf2-ARE (elementos de resposta antioxidante) (Hotta; Uchiyama; Ichihara, 2020). Em células HEK293 (células renais embrionárias humanas), a PVB e seus componentes ativaram genes regulados pela sequência ARE, aumentando a expressão de genes regulados por Nrf2 e promovendo o acúmulo de Nrf2 no núcleo celular. Além disso, reduziu a geração de ERO e a citotoxicidade induzida por *tert*-butil hidroperóxido (Hotta; Uchiyama; Ichihara, 2020). Quando administrado oralmente em camundongos, a PVB aumentou a expressão de genes regulados por Nrf2 no fígado (Hotta; Uchiyama; Ichihara, 2020). Em conjunto aos resultados obtidos, estes dados sugerem que a administração oral de PVB pode ser um recurso promissor na prevenção de doenças relacionadas ao estresse oxidativo, agindo como um indutor de Nrf2.

Outro achado importante em nosso estudo, foi a recuperação da atividade da enzima paraoxonase 1 (PON-1) no plasma dos animais tratados com PVB isoladamente ou combinados com metformina, quando comparados com os animais que consumiram dieta hiperlipídica (HL) ou que foram tratados apenas com iogurte (HI). A PON-1 trata-se de uma enzima associada à lipoproteína HDL e possui propriedades antioxidantes (Aviram; Rosenblat, 2005), sendo capaz de proteger os lipídeos carregados em LDL e HDL, bem como os macrófagos, contra eventos oxidativos (Mastorikou; Mackness; Mackness, 2006; Sampson et al., 2005). Uma hipótese para

a diminuição na atividade da PON-1 em plasma de animais diabéticos está relacionada a baixa concentração de HDL (Aviram; Rosenblat, 2005).

Outra possibilidade, são as modificações pós-traducionais da enzima, como o processo de glicação, reduzindo sua atividade antioxidante (Bacchetti et al., 2014; Karabina et al., 2005). Evidências indicam que PON-1 é vulnerável às ações deletérias de agentes que promovem sua oxidação (Roxo et al., 2019), como o estresse oxidativo, relacionado com um aumento em processos de peroxidação lipídica tanto de lipídeos de membrana quanto em componentes de lipoproteínas (Steinberg, 1997).

Nossos achados indicam que as duas hipóteses podem contribuir para a redução da atividade de PON-1 em animais que consumiram a dieta H. Uma vez que, os níveis de HDL-colesterol nestes animais também foram reduzidos quando comparados aos grupos de dieta normolipídicas e concomitantemente foram observados valores elevados de TBARS e AGE fluorescentes no plasma desses grupos, caracterizando o estabelecimento do estresse-oxidativo. O estado de normalidade para esses parâmetros analisados só foi atingido nos grupos tratados com PVB e metformina, isolados ou combinados (HP, HM e HPM). Resultados similares foram encontrados em estudos com camundongos C57BL-6 em modelo de obesidade e resistência a insulina que fizeram uso da dieta hiperlipídica (Motta et al., 2022; Talpo et al., 2022).

A escolha pelo uso da metformina para o DM tipo 2 está relacionada não somente a sua ação antihiperlipêmica, mas também devido a sua capacidade em diminuir os níveis de AGE (Beisswenger; Ruggiero-Lopez, 2003; Motta et al., 2022) e TBARS (Figueiredo et al., 2020; Peixoto et al., 2017) no plasma, fígado e rim de animais com modelos de estresse oxidativo.

Em condições diabéticas, as ERO são produzidas em vários tecidos pelo maior desvio no transporte de elétrons mitocondriais, glicação não enzimática, auto oxidação da glicose e ativação da NADPH oxidase (Nox) (Newsholme et al., 2019). O estresse oxidativo e o dano oxidativo também são observados em vários tecidos, incluindo fígado e rim de animais diabéticos (Jha et al., 2018; Patche et al., 2017). Assim, as capacidades antioxidantes dos tecidos podem ser testadas para elucidar as propriedades antidiabéticas de diferentes compostos bioativos. Para este propósito, a atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx foram quantificadas.

A atividade das enzimas antioxidantes foi reduzida em ambos os tecidos analisados: hepático e renal, dos animais que consumiram a dieta hiperlipídica (grupo HL). Essa mudança no perfil redox desses animais já era esperado, uma vez que, tanto o sistema antioxidante enzimático quanto o não enzimático são essenciais para a resposta celular e quando ocorrem variações e perturbações desse sistema, ocasionam danos celulares causados pelo estresse oxidativo que resulta no desenvolvimento de complicações diabéticas (Afsharpour et al., 2019). Portanto, os níveis de enzimas antioxidantes como CAT, SOD e GPx são afetados e usados como índices para avaliar o nível de estresse oxidativo (Dey; Lakshmanan, 2013; Medina; Moreno-Otero, 2005).

Quando há o agravamento de lesões no tecido hepático associado ao estresse glico-oxidativo, ocorrem eventos característicos desse dano tecidual, como o acúmulo de MDA, AGE, proteínas carboniladas (PCO), diminuição nas atividades de enzimas antioxidantes, infiltração leucocitária e aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias (Dey; Lakshmanan, 2013; Medina; Moreno-Otero, 2005). Os tratamentos com PVB e metformina incorporados ao iogurte, isoladamente e em combinação, conseguiram recuperar a atividade de todas as enzimas antioxidantes no fígado, indicando uma redução das complicações associadas a obesidade, parcialmente explicado pela diminuição do estresse oxidativo nesse tecido, com menores níveis de TBARS e AGE fluorescentes como descrito anteriormente.

Nas estratégias terapêuticas com combinações de compostos bioativos naturais que amenizam o estresse glico-oxidativo e em especial a hiperglicemia, nota-se o aumento da atividade de enzimas antioxidantes (Assis et al., 2017; Figueiredo et al., 2020; Motta et al., 2022; Prabhakar; Kumar; Doble, 2014; Salehi et al., 2019; Talpo et al., 2022; Yeh et al., 2017) devido a menor glicação das enzimas antioxidantes, que ocorrem em altas concentrações de glicose intra- e extracelular, e consequentes mudanças conformacionais (Szaleczky et al., 1999).

Embora não existam muitos trabalhos que indiquem o potencial da PVB e/ou seus compostos em induzir a expressão de enzimas antioxidantes, Hotta e colaboradores (2020) demonstraram que o extrato etanólico de PVB consegue elevar a expressão de genes de enzimas antioxidantes, como NAD(P)H desidrogenase – quinona 1 (Nqo1), Heme oxigenase 1, Glutamato-cisteína ligase e Glutathione S-transferase (alfa 1 e alfa 2), por vias reguladas pelo Nrf2 no fígado de camundongos. Contudo, foi relatado que a expressão de genes para CAT e glicose-6-fosfato

desidrogenase X-ligado (G6pdx), não foi aumentada pelo tratamento com PVB (Hotta; Uchiyama; Ichihara, 2020), implicando que o aumento de atividade da CAT observado em nosso estudo não deve ser pelo aumento da expressão do gene desta enzima. Esses dados indicam que a indução da expressão de enzimas antioxidantes e a redução do estresse glico-oxidativo são duas vias possíveis para explicar a recuperação de atividade enzimática encontrado em nosso estudo.

No tecido renal, os tratamentos com PVB, metformina e sua combinação, impactaram diferentemente a atividade das enzimas antioxidantes. A PVB isolada e em combinação com metformina, recuperou a atividade de CAT e GPx neste tecido, o que pode ser explicado de maneira semelhante ao que ocorre no fígado. Entretanto, nenhum dos tratamentos apresentou efeito positivo sobre a SOD no rim. A resposta do sistema antioxidante ao estresse glico-oxidativo em diferentes tecidos, evidencia, discrepâncias relacionadas aos potenciais antioxidantes específicos, no qual, as interações metabólicas existentes entre hiperglicemia e estresse oxidativo, em conjunto, contribuem para causar stress glico-oxidativo tecido-específico e inflamação de baixo grau através de uma variedade de mediadores moleculares (González et al., 2023).

Um trabalho de revisão sistemática recente sobre o potencial do extrato de própolis no diabetes induzida experimentalmente, realizado por Cunha e colaboradores (2023), relata que diferentes variedades de própolis tem a capacidade de elevar os níveis das defesas antioxidantes em sistemas modelos *in vivo*. Nos diferentes estudos analisados não há uma correlação direta entre os compostos presentes no extrato de própolis ou as vias metabólicas relacionadas a este potencial antioxidante. O trabalho conclui que este potencial está relacionado com a neutralização de ERO e possivelmente com a ativação da via de Nrf2, como mencionado anteriormente, uma ação já atribuída ao extrato de PVB (Cunha et al., 2023; Hotta; Uchiyama; Ichihara, 2020).

O tratamento com metformina isolada em nosso estudo, não apresentou efeitos sobre as atividades da SOD e CAT no rim de animais que consumiram a dieta hiperlipídica, recuperando apenas a atividade de GPx neste tecido. Resultados semelhantes foram relatados em estudos envolvendo o tratamento de camundongos C57BL/6 em modelo de obesidade e resistência à insulina e tratados com metformina na mesma dose utilizada em nosso trabalho (50 mg/kg), com o fármaco melhorando a atividade das enzimas antioxidantes no tecido hepático, mas também

não recuperando os níveis de atividade no rim para SOD (Motta et al., 2022) e CAT (Motta et al., 2022; Talpo et al., 2022). A ausência de ação do fármaco para estas enzimas neste tecido, foi correlacionada ao processo de glicação das enzimas antioxidantes e o estresse glico-oxidativo tecido-específico, também citado anteriormente.

A inflamação local induzida por ROS contribui para o desenvolvimento e progressão de complicações diabéticas, como nefropatia, retinopatia e doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD) (Jha et al., 2018; Santiago et al., 2018; Spahis et al., 2017; Wu et al., 2018). Além disso, a promoção da lipólise em adipócitos causa circulação elevada de colesterol-lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL-C) e colesterol-lipoproteína de densidade baixa (LDL-C), os quais são considerados determinantes-chave da patogênese da aterosclerose (Rudel et al., 1986). Posteriormente, quantidades excessivas de lipídios são depositadas nos hepatócitos, resultando no desenvolvimento de NAFLD (Farrell et al., 2019; Liu; Bengmark; Qu, 2010). Portanto, acredita-se que o diabetes tipo 2 seja um dos principais fatores de exacerbação da NAFLD e de NASH (*nonalcoholic steatohepatitis*) (Walenbergh et al., 2013).

Para avaliar as funções hepáticas e renais no contexto dessas complicações, foram analisados biomarcadores plasmáticos, incluindo as enzimas fosfatase alcalina (ALP), aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), associadas à injúria hepática, além dos metabólitos ureia e ácido úrico, relacionados à função renal. No modelo experimental adotado, não foram detectadas alterações nesses parâmetros. Embora existam evidências de que o estresse glico-oxidativo foi estabelecido neste modelo *in vivo*, a ausência de alterações nesses biomarcadores indica que o design experimental utilizado não foi suficiente para evidenciar por completo o potencial da PVB como agente renoprotetor (Da Costa et al., 2015; Teles et al., 2015) e hepatoprotetor (Kismet et al., 2017).

A ausência de alterações nestes parâmetros já foi observada em outros estudos com protocolos semelhantes (Costa et al., 2020; Inacio et al., 2020; Talpo et al., 2022), reafirmando a importância de pesquisar e estabelecer protocolos pré-clínicos fidedignos das condições fisiopatológicas associadas as diferentes patologias para testar terapias potenciais.

Embasados por estes resultados evidenciados, podemos afirmar que o tratamento com PVB sozinha ou em combinação com metformina em animais

obesos com sintomas de hiperglicemia e resistência à insulina, conseguiu reduzir os marcadores de estresse glico-oxidativo e restaurou o sistema antioxidante enzimático destes animais, recuperando o equilíbrio redox.

7. Conclusão

Os resultados obtidos em nossos estudos fisiológicos, bioquímicos e de biomarcadores de estresse glico-oxidativo, nos permitem concluir que a Própolis Vermelha Brasileira (PVB) incorporada ao iogurte, administrada de forma isolada ou combinada com metformina, apresenta efeitos positivos em camundongos no modelo de obesidade e resistência à insulina por meio da dieta hiperlipídica. O tratamento durante 8 semanas com PVB ou metformina foi eficaz no controle do ganho de peso, redução dos níveis séricos de glicose, redução da dislipidemia e níveis de TBARS e AGE no plasma, fígado e rim, e recuperou a atividade de enzimas antioxidantes (PON-1, SOD, CAT e GPx) nestes tecidos. A terapia combinada de PVB e metformina, preservou os efeitos isolados encontrados de ambos os produtos. Esses achados sugerem que a PVB pode ser uma opção promissora para abordar os problemas de saúde relacionados a obesidade e resistência à insulina em humanos, com potencial para reduzir o estresse oxidativo associado a essas condições.

Referências

- ABBAS, G. *et al.* Antiglycation therapy: Discovery of promising antiglycation agents for the management of diabetic complications. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 2, p. 198–206, 2016.
- ABD EL-SALAM, E. A.; MORSY, N. F. S. Optimization of the extraction of polyphenols and antioxidant activity from *Malva parviflora* L. leaves using Box–Behnken design. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 49, n. 9, p. 876–883, 2019.
- AFSHARPOUR, F. *et al.* Propolis supplementation improves glycemic and antioxidant status in patients with type 2 diabetes: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. **Complementary therapies in medicine**, v. 43, p. 283–288, abr. 2019.
- AKHTAR, M. *et al.* Diabetic Kidney Disease: Past and Present. **Advances in Anatomic Pathology**, v. 00, n. 00, 2019.
- AL GHAMDI, A. A. *et al.* Oral supplementation of diabetic mice with propolis restores the proliferation capacity and chemotaxis of B and T lymphocytes towards CCL21 and CXCL12 by modulating the lipid profile, the pro-inflammatory cytokine levels and oxidative stress. **BMC Immunology**, v. 16, n. 1, p. 1–14, 2015.
- ALENCAR, S. M. *et al.* Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis : Red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, p. 278–283, 2007.
- ALLAIN, C. C. *et al.* Enzymatic Determination of Total Cholesterol in Serum. **Clin. Chem.**, v. 20, n. 4, p. 470–475, 1974.
- ANDERSON, J. W.; GILLILAND, S. E. Effect of Fermented Milk (Yogurt) Containing *Lactobacillus Acidophilus* L1 on Serum Cholesterol in Hypercholesterolemic Humans. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 18, n. 1, p. 43–50, 1999.
- ARULSELVAN, P. *et al.* Role of Antioxidants and Natural Products in Inflammation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016.
- ASHRAF, R.; SHAH, N. P. Immune System Stimulation by Probiotic Microorganisms. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 54, n. 7, p. 938–956, 2014.

- ASIOLI, D.*et al.* Making sense of the “clean label” trends: A review of consumer food choice behavior and discussion of industry implications. **Food Research International**, v. 99, n. April, p. 58–71, 2017.
- ASO, K. *et al.* Inhibitory Effect of Propolis on the Growth of Human Leukemia U937. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 5, p. 727–730, 2004.
- ASSIS, R. P. *et al.* Combined effects of curcumin and lycopene or bixin in yoghurt on inhibition of LDL oxidation and increases in HDL and paraoxonase levels in streptozotocin-diabetic rats. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 4, 2017.
- ASTRUP, A.. Yogurt and dairy product consumption to prevent cardiometabolic diseases: Epidemiologic and experimental studies. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 99, n. 5, p. 1235S-1242S, 2014.
- AVIRAM, M.; ROSENBLAT, M. Paraoxonases and cardiovascular diseases: Pharmacological and nutritional influences. **Current Opinion in Lipidology**, v. 16, n. 4, p. 393–399, 2005.
- BACCHETTI, T. *et al.* Glycation of human high density lipoprotein by methylglyoxal: Effect on HDL-paroxonase activity. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 63, n. 3, p. 307–311, 2014.
- BAILEY, C. J.; TURNER, R. C. Metformin. **The New England Journal of Medicine**, v. 334, n. 9, p. 574–579, 1996.
- BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1–2, p. 114–117, 2005.
- BANKOVA, V. S.; CASTRO, S. L. D. E.; MARCUCCI, M. C. Review article Propolis : recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v. 31, p. 3–15, 2000.
- BARBOSA BEZERRA, G. *et al.* Hydroalcoholic extract of Brazilian red propolis exerts protective effects on acetic acid-induced ulcerative colitis in a rodent model. **BIOMEDICINE & PHARMACOTHERAPY**, v. 85, p. 687–696, jan. 2017.
- BASTA, G. *et al.* What is the role of the receptor for advanced glycation end products-ligand axis in liver injury? **Liver Transplantation**, v. 17, p. 633–640, 2011.

BATISTA, L. L. V. *et al.* Comparative study of topical green and red propolis in the repair of wounds induced in rats. **Revista do Colegio Brasileiro de Cirurgioes**, v. 39, n. 6, p. 515–520, 2012.

BEAUCHAMP C, F. I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Anal Biochem**, v. 44, p. 276–87, 1971.

BEECHER, G. R. Proceedings of the Third International Scientific Symposium on Tea and Human Health : Role of Flavonoids in the Diet Overview of Dietary Flavonoids : Nomenclature , Occurrence and Intake. **The Journal of Nutrition**, p. 3248–3254, 2003.

BEERS, R. F.; SIZER, I. W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. **The Journal of biological chemistry**, v. 195, n. 1, p. 133–140, 1952.

BEISSWENGER, P. J.; RUGGIERO-LOPEZ, D. Metformin inhibition of glycation processes. **Diabetes and Metabolism**, v. 29, n. 4 II, p. 6S95-6S103, 2003.

BHARGAVA, P.; SCHNELLMANN, R. G. Mitochondrial energetics in the kidney. **Nature Reviews Nephrology**, v. 13, n. 10, p. 629–646, 2017.

BIERHAUS, A. *et al.* AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. **Cardiovascular Research**, v. 37, n. 3, p. 586–600, 1998.

BOEING, T. *et al.* The gastroprotective effect of red propolis extract from Northeastern Brazil and the role of its isolated compounds. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 267, n. August 2020, 2021.

BRANDT, A. *et al.* Metformin attenuates the onset of non-alcoholic fatty liver disease and affects intestinal microbiota and barrier in small intestine. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–14, 2019.

BUENO-SILVA, B. *et al.* Effect of neovestitol-vestitol containing Brazilian red propolis on accumulation of biofilm in vitro and development of dental caries in vivo. **Biofouling**, v. 29, n. 10, p. 1233–1242, 2013a.

BUENO-SILVA, B. *et al.* Anti-inflammatory and antimicrobial evaluation of neovestitol and vestitol isolated from brazilian red propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 19, p. 4546–4550, 2013b.

BUENO-SILVA, B. *et al.* Brazilian red propolis attenuates inflammatory signaling cascade in Ipsactivated macrophages. **PLoS ONE**, v. 10, n. 12, p. 1–14, 2015.

BUENO-SILVA, B. *et al.* The effect of seasons on Brazilian red propolis and its botanical source: chemical composition and antibacterial activity. **Natural Product Research**, v. 31, n. 11, p. 1318–1324, 2017.

BURDOCK, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). **Food and Chemical Toxicology**, v. 36, n. 4, p. 347–363, 1998.

BURSTEIN, M.; SCHOLNICK, H. R.; MORFIN, R. Rapid Method for the Isolation of Lipoproteins from Human Serum by Precipitation with Polyanions. **J. Lipid Research**, v. 11, n. 583, 1970.

CABRAL, I. S. R. *et al.* Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1523–1527, 2009.

CAROCHO, M. *et al.* Adding molecules to food, pros and cons: A review on synthetic and natural food additives. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 4, p. 377–399, 2014.

CASTRO, M. L. *et al.* Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: Influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. **Química Nova**, v. 30, n. 7, p. 1512–1516, 2007.

CHAUDHURI, J. *et al.* The role of advanced glycation end products in aging and metabolic diseases: bridging association and causality. **Cell Metab**, v. 28, n. 3, p. 337–352, 2018.

CHEANG, W. S. *et al.* Metformin protects endothelial function in diet-induced obese mice by inhibition of endoplasmic reticulum stress through 5' adenosine monophosphate-Activated protein kinase-peroxisome proliferator-Activated receptor δ pathway. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 34, n. 4, p. 830–836, 2014.

CHEUNG, T. T. L. *et al.* Consumers' choice-blindness to ingredient information. **Appetite**, v. 106, p. 2–12, 2016.

COSTA, L. G. *et al.* Serum paraoxonase and its influence on paraoxon and chlorpyrifos-oxon toxicity in rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 103, n. 1, p. 66–76, 1990.

- COSTA, M. C. *et al.* Trigonelline and curcumin alone, but not in combination, counteract oxidative stress and inflammation and increase glycation product detoxification in the liver and kidney of mice with high-fat diet-induced obesity. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 76, n. 305936, p. 108303, 2020.
- CUNHA, G. A. D. *et al.* A Systematic Review of the Potential Effects of Propolis Extracts on Experimentally-induced Diabetes. **Planta Medica**, v. 89, n. 3, 2023.
- CUNHA, I. B. S. *et al.* Antitrypanosomal Activity of Brazilian Propolis from *Apis mellifera*. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 52, n. 5, p. 602–604, 2004.
- DA COSTA, M. F. *et al.* Red propolis ameliorates ischemic-reperfusion acute kidney injury. **PHYTOMEDICINE**, v. 22, n. 9, p. 787–795, 2015.
- DEY, A.; LAKSHMANAN, J. The role of antioxidants and other agents in alleviating hyperglycemia mediated oxidative stress and injury in liver. **Food and Function**, v. 4, n. 8, p. 1148–1184, 2013.
- DEY, L.; ATTELE, A. S.; YUAN, C. S. Alternative therapies for type 2 diabetes. **Altern Med Rev**, v. 7, n. 1, p. 45–58, 2002.
- DUARTE-ALMEIDA, J. M. *et al.* Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema beta-caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH• . **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 446–452, 2006.
- FARRELL, G. *et al.* Mouse Models of Nonalcoholic Steatohepatitis: Toward Optimization of Their Relevance to Human Nonalcoholic Steatohepatitis. **Hepatology**, v. 69, n. 5, p. 2241–2257, 2019.
- FIGUEIREDO, I. D. *et al.* Lycopene improves the metformin effects on glycemic control and decreases biomarkers of glycoxidative stress in diabetic rats. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity**, v. 13, p. 3117–3135, 2020.
- FIGUEIREDO, I. D. *et al.* Lycopene in Combination with Insulin Triggers Antioxidant Defenses and Increases the Expression of Components That Detoxify Advanced Glycation Products in Kidneys of Diabetic Rats. **Nutrients**, v. 16, n. 11, 2024.
- FLORY, J. H. *et al.* Overcoming barriers to the use of metformin: Patient and provider perspectives. **Patient Preference and Adherence**, v. 13, p. 1433–1441, 2019.

- FULLERTON, M. D. *et al.* Single phosphorylation sites in Acc1 and Acc2 regulate lipid homeostasis and the insulin-sensitizing effects of metformin. **Nature Medicine**, v. 19, n. 12, p. 1649–1654, 2013.
- GALLE, J. *et al.* Impact of oxidized low density lipoprotein on vascular cells. **Atherosclerosis**, v. 185, n. 2, p. 219–226, 2006.
- GASSAWAY, B. M. *et al.* PKC ϵ contributes to lipid-induced insulin resistance through cross talk with p70S6K and through previously unknown regulators of insulin signaling. **PNAS**, v. 115, n. 38, p. E8996–E9005, 2018.
- GHISALBERTI, E. L. Propolis: A Review. **Bee World**, n. July, p. 59–84, 1979.
- GONZÁLEZ, P. *et al.* Hyperglycemia and Oxidative Stress: An Integral, Updated and Critical Overview of Their Metabolic Interconnections. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 11, 2023.
- GONZÁLEZ-MUNIESA, P. *et al.* Obesity. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, 2017.
- GUTIERRES, V. O. *et al.* Curcumin improves the effect of a reduced insulin dose on glycemic control and oxidative stress in streptozotocin-diabetic rats. **Phytotherapy Research**, v. 33, n. 4, p. 976–988, 2019.
- GUTTERIDGE, J. M. C.; HALLIWELL, B. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 393, n. 4, p. 561–564, 2010.
- HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 96, n. 2–3, p. 67–202, 2002.
- HESAMI, S. *et al.* Administration of Iranian Propolis attenuates oxidative stress and blood glucose in type II diabetic patients: A randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical trial. **Caspian Journal of Internal Medicine**, v. 10, n. 1, p. 48–54, 2019.
- HEYDEMANN, A. An Overview of Murine High Fat Diet as a Model for Type 2 Diabetes Mellitus. **Journal of Diabetes Research**, v. 2016, 2016.

HO, E.; BRAY, T. M. Antioxidants, NFkB activation, and diabetogenesis.

Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, v. 222, n. 3, p. 205–213, 1999.

HOTTA, S.; UCHIYAMA, S.; ICHIHARA, K. Brazilian red propolis extract enhances expression of antioxidant enzyme genes *in vitro* and *in vivo*. **BIOSCIENCE BIOTECHNOLOGY AND BIOCHEMISTRY**, v. 84, n. 9, p. 1820–1830, 2020.

HUANG, Y. *et al.* The complexity of the Nrf2 pathway: Beyond the antioxidant response. **J Nutr Biochem**, v. 26, n. 12, p. 1401–1413, 2015.

HYOGO, H.; YAMAGISHI, S. Advanced Glycation End Products and Their Involvement in Liver Disease. **Current Pharmaceutical Design**, v. 14, p. 969–972, 2008.

IBRAHIM, K. A. *et al.* Propolis relieves the cardiotoxicity of chlorpyrifos in diabetic rats via alleviations of paraoxonase-1 and xanthine oxidase genes expression. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 159, p. 127–135, set. 2019.

ICHI, I. *et al.* The beneficial effect of propolis on fat accumulation and lipid metabolism in rats fed a high-fat diet. **Journal of food science**, v. 74, n. 5, p. H127-31, jun. 2009.

IIO, A. *et al.* Ethanolic extracts of Brazilian red propolis promote adipocyte differentiation through PPAR γ activation. **Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 17, n. 12, p. 974–979, out. 2010.

INACIO, M. D. *et al.* Pentoxifylline mitigates renal glycoxidative stress in obese mice by inhibiting AGE/RAGE signaling and increasing glyoxalase levels. **Life Sciences**, v. 258, n. July, p. 118196, 2020.

ÍTAVO, C. C. B. F. *et al.* Addition of propolis or monensin in the diet: Behavior and productivity of lambs in feedlot. **Animal Feed Science and Technology**, v. 165, n. 3–4, p. 161–166, 2011.

JADEJA, R. N. *et al.* Naturally occurring Nrf2 activators: Potential in treatment of liver injury. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016.

JHA, J. C. *et al.* A causal link between oxidative stress and inflammation in cardiovascular and renal complications of diabetes. **Clinical Science**, v. 132, n. 16, p. 1811–1836, 2018.

KAGEYAMA, N. Direct Colorimetric Determination of Uric Acid in Serum and Urine with Uricase-Catalysts System. **Clin. Chem. Acta.**, v. 31, n. 421, 1971.

KANG, L. J. *et al.* Antidiabetic effect of propolis: Reduction of expression of glucose-6-phosphatase through inhibition of Y279 and Y216 autophosphorylation of GSK-3 α/β in HepG2 cells. **Phytotherapy Research**, v. 24, n. 10, p. 1554–1561, 2010.

KARABINA, S. A. P. *et al.* Oxidative inactivation of paraoxonase - Implications in diabetes mellitus and atherosclerosis. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1725, n. 2, p. 213–221, 2005.

KHENISER, K. G.; KASHYAP, S. R.; KASUMOV, T. A systematic review: the appraisal of the effects of metformin on lipoprotein modification and function. **Obesity Science and Practice**, v. 5, n. 1, p. 36–45, 2019.

KIM, E. K. *et al.* Metformin prevents fatty liver and improves balance of white/brown adipose in an obesity mouse model by inducing FGF21. **Mediators of Inflammation**, v. 2016, p. 1–13, 2016.

KISMET, K. *et al.* Does propolis have any effect on non-alcoholic fatty liver disease? **BIOMEDICINE & PHARMACOTHERAPY**, v. 90, p. 863–871, jun. 2017.

KITAMURA, H. Effects of Propolis Extract and Propolis-Derived Compounds on Obesity and Diabetes: Knowledge from Cellular and Animal Models. **MOLECULES**, v. 24, n. 23, 2019.

KLEIN, J. *et al.* Metformin inhibits leptin secretion via a mitogen-activated protein kinase signalling pathway in brown adipocytes. **Journal of Endocrinology**, v. 183, n. 2, p. 299–307, 2004.

KOHN, H. I.; LIVERSEDGE, M. On a new aerobic metabolite whose production by brain is inhibited by apomorphine, emetine, ergotamine, epinephrine, and menadione. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 82, p. 292–300, 1944.

KOYA-MIYATA, S. *et al.* Propolis prevents diet-induced hyperlipidemia and mitigates weight gain in diet-induced obesity in mice. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 32, n. 12, p. 2022–2028, dez. 2009.

KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry**, v. 84, n. 3, p. 329–339, 2004.

LI, R. *et al.* Metformin ameliorates obesity-associated hypertriglyceridemia in mice partly through the apolipoprotein A5 pathway. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 478, n. 3, p. 1173–1178, 2016.

LIMA, B. *et al.* Main Flavonoids, DPPH Activity, and Metal Content Allow Determination of the Geographical Origin of Propolis from the Province of San Juan (Argentina). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 7, p. 2691–2698, 8 abr. 2009.

LIU, Q.; BENGMARK, S.; QU, S. The role of hepatic fat accumulation in pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Lipids in Health and Disease**, v. 9, p. 1–9, 2010.

LIU, Y. *et al.* Galangin and Pinocembrin from Propolis Ameliorate Insulin Resistance in HepG2 Cells via Regulating Akt/mTOR Signaling. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2018, 2018.

LOPEZ, B. G. C. *et al.* Antimicrobial and cytotoxic activity of red propolis: An alert for its safe use. **Journal of Applied Microbiology**, v. 119, n. 3, p. 677–687, 2015.

LOWRY, O. H. *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.

MACHADO, C. S. *et al.* Comparative Study of Chemical Composition and Biological Activity of Yellow, Green, Brown, and Red Brazilian Propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, n. type 12, p. 1–11, 2016.

MADIRAJU, A. K. *et al.* Metformin suppresses gluconeogenesis by inhibiting mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase. **Nature**, v. 510, n. 7506, p. 542–546, 2014.

MADJAROF, C. **Atividade antitumoral, antiinflamatória e antiulcerogênica de duas variedades de própolis brasileira.** [S.l.]: Universidade Estadual de Campinas, 2009.

MANACH, C. *et al.* Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, p. 727–747, 2004.

MARCUCCI, M. C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, v. 26, n. 2, p. 83–99, 1995.

MARCUCCI, M. C. *et al.* Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **Journal of ethnopharmacology**, v. 74, n. 2, p. 105–12, 2001.

MARÍN-PENÁLVER, J. J. *et al.* Update on the treatment of type 2 diabetes mellitus. **World Journal of Diabetes**, v. 7, n. 17, p. 354, 2016.

MARKET RESEARCH FUTURE. **Propolis Market Research Report**. Disponível em: <<https://www.marketresearchfuture.com/reports/propolis-market-782>>. Acesso em: 14 ago. 2021.

MASTORIKOU, M.; MACKNESS, M.; MACKNESS, B. Defective metabolism of oxidized phospholipid by HDL from people with type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 55, n. 11, p. 3099–3103, 2006.

MATSUI, Y. *et al.* Metformin reduces body weight gain and improves glucose intolerance in high-fat diet-fed C57BL/6J Mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 33, n. 6, p. 963–970, 2010.

MAZZA, A. *et al.* The role of metformin in the management of NAFLD. **Experimental Diabetes Research**, v. 2012, n. January, 2012.

MEDINA, J.; MORENO-OTERO, R. Pathophysiological basis for antioxidant therapy in chronic liver disease. **Drugs**, v. 65, n. 17, p. 2445–2461, 2005.

MENDONÇA-MELO, L. *et al.* Similitud química y genética entre propóleos de *Dalbergia ecastaphyllum* y rojos del Noreste de Brasil. **Journal of Apicultural Research**, v. 56, n. 1, p. 32–39, 2017.

MENESES, M. J. *et al.* Paraoxonase-1 as a regulator of glucose and lipid homeostasis: Impact on the onset and progression of metabolic disorders. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 16, p. 1–22, 2019.

MENEZES, H. Própolis: Uma Revisão Dos Recentes Estudos. **Arq. Inst. Biologia**, v. 72, n. 3, p. 405–411, 2005.

MIGLIORE, L. J. *et al.* A new species of jewel beetle (Coleoptera, Buprestidae, *Agrilus*) triggers the production of the Brazilian red propolis. **Science of Nature**, v. 109, n. 2, 2022.

MONTPIED, P. *et al.* Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) prevents inflammatory stress in organotypic hippocampal slice cultures. **Molecular Brain Research**, v. 115, n. 2, p. 111–120, 2003.

MORSY, A. S. *et al.* Effect of Brazilian red propolis administration on hematological, biochemical variables and parasitic response of Santa Inês ewes during and after flushing period. **Tropical Animal Health and Production**, v. 45, n. 7, p. 1609–1618, 2013.

MOTTA, B. P. *et al.* Combined Effects of Lycopene and Metformin on Decreasing Oxidative Stress by Triggering Endogenous Antioxidant Defenses in Diet-Induced Obese Mice. **Molecules**, v. 27, n. 23, 2022.

MUJICA, V. *et al.* The Role of Propolis in Oxidative Stress and Lipid Metabolism: A Randomized Controlled Trial. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, 2017.

NAGAI, T. *et al.* Preparation and antioxidant properties of water extract of propolis. **Food Chemistry**, v. 80, n. 1, p. 29–33, 2003a.

NAGAI, T. *et al.* Preparation and antioxidant properties of water extract of propolis. **Food Chemistry**, v. 80, n. 1, p. 29–33, 2003b.

NEGRI, G.; SALATINO, M. L. F.; SALATINO, A. 'Green propolis': Unreported constituents and a novel compound from chloroform extracts. **Journal of Apicultural Research**, v. 42, n. 3, p. 39–41, 2003.

NEMET, I.; STRAUCH, C. M.; MONNIER, V. M. Favored and disfavored pathways of protein crosslinking by glucose: glucose lysine dimer (GLUCOLD) and crossline versus glucosepane. **Amino Acids**, v. 40, n. 1, p. 167–181, 2011.

NEWSHOLME, P. *et al.* Oxidative stress pathways in pancreatic β -cells and insulin-sensitive cells and tissues: importance to cell metabolism, function, and dysfunction. *American journal of physiology*. **Cell physiology**, v. 317, n. 3, p. C420–C433, set. 2019.

NISHIKAWA, T. *et al.* Impact of mitochondrial ROS production on diabetic vascular complications. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 77, n. 3 SUPPL., p. 41–45, 2007.

NNA, V. U. *et al.* Antioxidant, anti-inflammatory and synergistic anti-hyperglycemic effects of Malaysian propolis and metformin in streptozotocin-induced diabetic rats.

FOOD AND CHEMICAL TOXICOLOGY, v. 120, p. 305–320, 2018.

NOWOTNY, K. *et al.* Advanced glycation end products and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. **Biomolecules**, v. 5, n. 1, p. 194–222, 2015.

NUGENT, MM; HE, JC. **How AGEs Cause Disease: Cellular Mechanisms**. In: Dietary AGEs and their role in health and disease. 1° ed. [S.l.]: Milton Park: Taylor & Francis Group, 2018a. p. 19–36.

NUGENT, MM; HE, JC. **How AGEs Cause Disease: Cellular Mechanisms**. In: Dietary AGEs and their role in health and disease. 1. ed. ed. [S.l.]: Milton Park: Taylor & Francis Group, 2018b. p. 19–36.

OKUNO, A. *et al.* Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. **Journal of Clinical Investigation**, v. 101, n. 6, p. 1354–1361, 1998.

OLDONI, T. L. C. *et al.* Isolation and analysis of bioactive isoflavonoids and chalcone from a new type of Brazilian propolis. **Separation and Purification Technology**, v. 77, n. 2, p. 208–213, 2011.

ORSOLIC, N.; BASIC, I. Antitumor, hematostimulative and radioprotective action of water-soluble derivative of propolis (WSDP). **BIOMEDICINE & PHARMACOTHERAPY**, v. 59, n. 10, p. 561–570, 2005.

OTT, C. *et al.* Role of advanced glycation end products in cellular signaling. **Redox Biology**, v. 2, n. 1, p. 411–429, 2014.

PALL, M. L.; LEVINE, S. Nrf2, a master regulator of detoxification and also antioxidant, anti-inflammatory and other cytoprotective mechanisms, is raised by health promoting factors. **Acta physiologica Sinica**, v. 67, n. 1, p. 1–18, 2015.

PARK, C. *et al.* Activation of the nrf2/ho-1 signaling pathway contributes to the protective effects of sargassum serratifolium extract against oxidative stress-induced dna damage and apoptosis in sw1353 human chondrocytes. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 6, p. 1–13, 2018.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, Claudio L. Botanical Origin and Chemical Composition of Brazilian Propolis. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, p. 2502–2506, 2002.

PATCHE, J. *et al.* Diabetes-induced hepatic oxidative stress: a new pathogenic role for glycated albumin. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 102, p. 133–148, 2017.

PAUDEL, P.; JUNG, H. A.; CHOI, J. S. Anthraquinone and naphthopyrone glycosides from *Cassia obtusifolia* seeds mediate hepatoprotection via Nrf2-mediated HO-1 activation and MAPK modulation. **Archives of Pharmacal Research**, v. 41, n. 6, p. 677–689, 2018.

PEIXOTO, L. G. *et al.* Metformin attenuates the TLR4 inflammatory pathway in skeletal muscle of diabetic rats. **Acta Diabetologica**, v. 54, n. 10, p. 943–951, 2017.

PEREIRA, A. S. *et al.* Distribution of quinic acid derivatives and other phenolic compounds in Brazilian propolis. **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, v. 58, n. 7–8, p. 590–593, 2003.

PILZ, J.; MEINEKE, I.; GLEITER, C. H. Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by high-performance liquid chromatography as the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 742, p. 315–325, 2000.

POKUPEC, R. *et al.* Advanced glycation endproducts in human diabetic and non-diabetic cataractous lenses. **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, v. 241, n. 5, p. 378–384, 2003.

PRABHAKAR, P. K.; KUMAR, A.; DOBLE, M. Combination therapy: A new strategy to manage diabetes and its complications. **Phytomedicine**, v. 21, n. 2, p. 123–130, 2014.

RABBANI, N.; XUE, M.; THORNALLEY, P. J. **Chapter 36 - Dicarbonyl stress and the glyoxalase system**. [S.l.]: Elsevier Inc., p. 759–777, 2020.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **Journal of Nutrition**, v. 123, n. 11, p. 1939–1951, 1993.

RENA, G.; HARDIE, D. G.; PEARSON, E. R. The mechanisms of action of metformin. **Diabetologia**, v. 60, n. 9, p. 1577–1585, 2017.

RICHTER, R. J.; JARVIK, G. P.; FURLONG, C. E. Determination of paraoxonase 1 status without the use of toxic organophosphate substrates. **Circulation**.

Cardiovascular genetics, v. 1, n. 2, p. 147–152, 2008.

RIFAI, N.; WARNICK, G. R. **Lipids, lipoproteins, Apolipoproteins, and other cardiovascular risk factors**. *In*: Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. [S.l.: S.n.]. p. 903–981.

RIVERA-YAÑEZ, N. *et al.* Biomedical properties of propolis on diverse chronic diseases and its potential applications and health benefits. **Nutrients**, v. 13, n. 1, p. 1–31, 2021.

ROXO, D. F. *et al.* Curcumin combined with metformin decreases glycemia and dyslipidemia, and increases paraoxonase activity in diabetic rats. **Diabetology and Metabolic Syndrome**, v. 11, n. 1, p. 1–8, 2019.

RUDEL, L. L. *et al.* Low density lipoproteins in atherosclerosis. **Journal of Lipid Research**, v. 27, n. 5, p. 465–474, 1986.

RUSH, J. W. E.; SANDIFORD, S. D. Plasma glutathione peroxidase in healthy young adults: Influence of gender and physical activity. **Clinical Biochemistry**, v. 36, n. 5, p. 345–351, 2003.

RUSSO, A. *et al.* Chilean propolis : antioxidant activity and antiproliferative action in human tumor cell lines. **Life Sci.**, v. 76, p. 545–558, 2004.

SAHINLER, N.; KAFTANOGLU, O. Natural product propolis: Chemical composition. **Natural Product Research**, v. 19, n. 2, p. 183–188, 2005.

SALATINO, A. *et al.* Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, n. 1, p. 33–38, 2005.

SALEHI, B. *et al.* Antidiabetic potential of medicinal plants and their active components. **Biomolecules**, v. 9, n.10, 2019.

SAMADI, N. *et al.* Effects of bee propolis supplementation on glycemic control, lipid profile and insulin resistance indices in patients with type 2 diabetes: a randomized, double-blind clinical trial. **Journal of integrative medicine**, v. 15, n. 2, p. 124–134, mar. 2017.

SAMPSON, E. J. *et al.* A coupled-enzyme equilibrium method for measuring urea in serum: optimization and evaluation of the AACC study group on urea candidate reference method. **Clin. Chem.**, v. 26, n. 7, p. 816–826, 1980.

SAMPSON, M. J. *et al.* Paraoxonase-1 (PON-1) genotype and activity and in vivo oxidized plasma low-density lipoprotein in Type II diabetes. **Clinical Science**, v. 109, n. 2, p. 189–197, 2005.

SANDERS, F. W. B.; GRIFFIN, Julian L. De novo lipogenesis in the liver in health and disease: More than just a shunting yard for glucose. **Biological Reviews**, v. 91, n. 2, p. 452–468, 2016.

SANTIAGO, A. R. *et al.* Sweet Stress: Coping with vascular dysfunction in diabetic retinopathy. **Frontiers in Physiology**, v. 9, n. JUL, p. 1–14, 2018.

SANTOS, M. S. *et al.* Probiotic Yogurt with Brazilian Red Propolis: Physicochemical and Bioactive Properties, Stability, and Shelf Life. **Journal of Food Science**, v. 84, n. 12, p. 3429–3436, 2019.

SCHEEN, A. J. Pathophysiology of type 2 diabetes. **Acta Clinica Belgica**, v. 58, n. 6, p. 335–341, 2003.

SEYYEDEBRAHIMI, S. S. *et al.* The effects of resveratrol on markers of oxidative stress in patients with type 2 diabetes: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. **Acta Diabetologica**, v. 55, n. 4, p. 341–353, 2018.

SFORCIN, J. M. *et al.* Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, n. 1–2, p. 243–249, 2000.

SFORCIN, J. M. Propolis and the immune system: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, n. 1, p. 1–14, 2007.

SHARMA, R. S. *et al.* Experimental Nonalcoholic Steatohepatitis and Liver Fibrosis Are Ameliorated by Pharmacologic Activation of Nrf2 (NF-E2 p45-Related Factor 2). **Cmgh**, v. 5, n. 3, p. 367–398, 2018.

SHI, L. *et al.* Baicalein and baicalin alleviate acetaminophen-induced liver injury by activating Nrf2 antioxidative pathway: The involvement of ERK1/2 and PKC. **Biochemical Pharmacology**, v. 150, p. 9–23, 2018.

SILICI, S.; KUTLUCA, S. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, n. 1, p. 69–73, 2005.

SILVA, B. B. *et al.* Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of Brazilian propolis. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, n. 3, p. 313–316, 2008.

SILVA, R. O. *et al.* Acute and sub-acute oral toxicity of Brazilian red propolis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 170, p. 66–71, 2015.

SILVEIRA, M. A. D. *et al.* Efficacy of Brazilian green propolis (EPP-AF®) as an adjunct treatment for hospitalized COVID-19 patients: A randomized, controlled clinical trial. **Diabetes Metab Syndr.**, v. 138, n. March, 2021.

SPAHIS, S. *et al.* Oxidative Stress as a Critical Factor in Nonalcoholic Fatty Liver Disease Pathogenesis. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 26, n. 10, p. 519–541, 2017.

STEINBERG, D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 34, p. 20963–20966, 1997.

SZALECZKY, E. *et al.* Alterations in enzymatic antioxidant defence in diabetes mellitus: A rational approach. **Postgraduate Medical Journal**, v. 75, n. 879, p. 13–17, 1999.

TABIT, C. E. *et al.* Endothelial dysfunction in diabetes mellitus: Molecular mechanisms and clinical implications. **Rev Endocr Metab Disord**, v. 11, n. 1, p. 61–74, 2010.

TALPO, T. C. *et al.* Siolmatra brasiliensis stem extract ameliorates antioxidant defenses and mitigates glycoxidative stress in mice with high-fat diet-induced obesity. **Obesity Research and Clinical Practice**, v. 16, n. 2, p. 130–137, 2022.

TEIXEIRA, É. W. *et al.* Plant Origin of Green Propolis: Bee Behavior, Plant Anatomy and Chemistry. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, n. 1, p. 85–92, 2005.

TELES, F. *et al.* Brazilian Red Propolis Attenuates Hypertension and Renal Damage in 5/6 Renal Ablation Model. **PLOS ONE**, v. 10, n. 1, jan. 2015.

- TESTA, R. *et al.* The “Metabolic Memory” Theory and the Early Treatment of Hyperglycemia in Prevention of Diabetic Complications. **Nutrients**, v. 9, n. 5, 2017.
- TOKUBUCHI, I. *et al.* Beneficial effects of metformin on energy metabolism and visceral fat volume through a possible mechanism of fatty acid oxidation in human subjects and rats. **PLoS ONE**, v. 12, n. 2, p. 1–16, 2017.
- TRINDER, P. Determination of blood glucose using 4-amino phenazone as oxygen acceptor. **Journal of Clinical Pathology**, v. 22, n. 2, p. 158–161, 1969.
- TRIVEDI, R. C. *et al.* New Enzymatic Method for Serum Uric Acid at 500nm. **Clin. Chem.**, v. 24, n. 1908, p. 191, 1978.
- TRUSHEVA, B. *et al.* Bioactive Constituents of Brazilian Red Propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 3, n. 2, p. 249–254, 2006.
- UEDA, M.; HAYASHIBARA, K.; ASHIDA, H. Propolis extract promotes translocation of glucose transporter 4 and glucose uptake through both PI3K-and AMPK-dependent pathways in skeletal muscle. **BIOFACTORS**, v. 39, n. 4, p. 457–466, jul. 2013.
- USMAN, U. Z.; BAKAR, A. B. A.; MOHAMED, M. Propolis improves pregnancy outcomes and placental oxidative stress status in streptozotocin-induced diabetic rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 18, n. 1, p. 2–7, 2018.
- VAN STEE, M. F.; DE GRAAF, A. A.; GROEN, A. K. Actions of metformin and statins on lipid and glucose metabolism and possible benefit of combination therapy. **Cardiovascular Diabetology**, v. 17, n. 1, p. 1–22, 2018.
- VEGIOPOULOS, A.; ROHM, M.; HERZIG, S. Adipose tissue: between the extremes. **The EMBO Journal**, v. 36, n. 14, p. 1999–2017, 2017.
- VIEIRA DE MORAIS, D. *et al.* Active antioxidant phenolics from brazilian red propolis: An optimization study for their recovery and identification by lc-esi-qtof-ms/ms. **Antioxidants**, v. 10, n. 2, p. 1–16, 2021.
- VISTOLI, G. *et al.* Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): An overview of their mechanisms of formation. **Free Radical Research**, v. 47, n. S1, p. 3–27, 2013.

VIUDA-MARTOS, M. *et al.* Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. **Journal of Food Science**, 2008.

VOLPE, C. M. O. *et al.* Cellular death, reactive oxygen species (ROS) and diabetic complications review-Article. **Cell Death and Disease**, v. 9, n. 2, 2018.

WALENBERGH, S. M. A. *et al.* Non-alcoholic steatohepatitis: The role of oxidized low-density lipoproteins. **Journal of Hepatology**, v. 58, n. 4, p. 801–810, 2013.

WASHBURN, W. N. Evolution of sodium glucose co-transporter 2 inhibitors as anti-diabetic agents. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 19, n. 11, p. 1485–1499, 2009.

WHO, World Health Organization. **Obesity and overweight**. [S.l.: S.n.], 2020.

WONG, S. Y. *et al.* Andrographolide induces Nrf2 and heme oxygenase 1 in astrocytes by activating p38 MAPK and ERK. **Journal of Neuroinflammation**, v. 13, n. 1, p. 1–12, 2016.

WU, M. Y. *et al.* The oxidative stress and mitochondrial dysfunction during the pathogenesis of diabetic retinopathy. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, 2018.

XIAO, Q. *et al.* Orientin-mediated Nrf2/HO-1 signal alleviates H₂O₂-induced oxidative damage via induction of JNK and PI3K/AKT activation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 118, p. 747–755, 2018.

XU, D. *et al.* The role of Nrf2 in liver disease: Novel molecular mechanisms and therapeutic approaches. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. JAN, p. 1–7, 2019.

YAMAGISHI, S. I.; MATSUI, T. Advanced glycation end products, oxidative stress and diabetic nephropathy. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 3, n. 2, p. 101–108, 2010.

YANNI, A. E.; KARTSIOTI, K.; KARATHANOS, V. T. The role of yoghurt consumption in the management of type II diabetes. **Food and Function**, v. 11, n. 12, p. 10306–10316, 2020.

YEH, W. J. *et al.* Polyphenols with antiglycation activity and mechanisms of action: A review of recent findings. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 25, n. 1, p. 84–92, 2017.

ZHOU, G. *et al.* Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. **J. Clin. Invest.**, v. 108, n. 8, p. 1167–1174, 2001.

ZHOU, K. *et al.* Variation in the glucose transporter gene SLC2A2 is associated with glycemic response to metformin. **Nat Genet**, v. 48, n. 9, p. 1055–1059, 2016.

ZILIN, S. *et al.* The determination of AGE-peptides by flow injection assay, a practical marker of diabetic nephropathy. **Clinica Chimica Acta**, v. 313, n. 1–2, p. 69–75, 2001.

APÊNDICE A – Composição química do Extrato de PVB

Tabela Suplementar 5 - Identificação de compostos fenólicos do extrato de PVB por LC-ESI-QTOF-MS/MS (adaptado de Vieira de Moraes, 2021¹).

No.	Composto	Fórmula Molecular
Flavonas		
1	Chrysin	C ₁₅ H ₁₀ O ₄
2	Tricin	C ₁₇ H ₁₄ O ₇
3	Genkwanin	C ₁₆ H ₁₂ O ₅
4	Hispidulin	C ₁₆ H ₁₂ O ₆
5	8-Hydroxy-5-methoxyflavanone	C ₁₆ H ₁₄ O ₄
6	Acacetin	C ₁₆ H ₁₂ O ₅
Flavononas		
7	Liquiritigenin	C ₁₅ H ₁₂ O ₄
8	Naringenin *	C ₁₅ H ₁₂ O ₅
9	Pinocembrin *	C ₁₅ H ₁₂ O ₄
10	5,6-Dihydroxy-3',4'-dimethoxyflavanone	C ₁₇ H ₁₆ O ₆
11	6-Hydroxyflavanone	C ₁₅ H ₁₂ O ₃
Chalconas		
12	Isoliquiritigenin *	C ₁₅ H ₁₂ O ₄
13	2',4'-Dihydroxychalcone	C ₁₅ H ₁₂ O ₃
14	7-hydroxyflavanone	C ₁₅ H ₁₂ O ₃
15	2',6'-dihydroxy-4'-methoxydihydrochalcone	C ₁₆ H ₁₆ O ₄
16	2'-Hydroxy-4'-methoxychalcone	C ₁₆ H ₁₄ O ₃
Isoflavonoides		

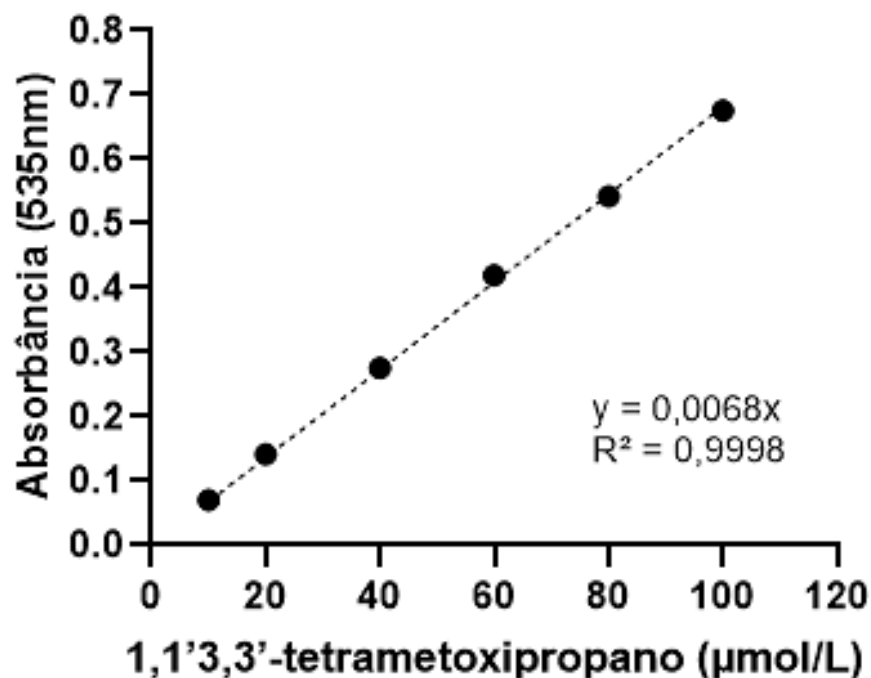
¹ VIEIRA DE MORAIS, Daniel *et al.* Active antioxidant phenolics from brazilian red propolis: An optimization study for their recovery and identification by lc-esi-qtof-ms/ms. *Antioxidants*, v. 10, n. 2, p. 1–16, 2021.

No.	Composto	Fórmula Molecular
17	Daidzein *	C15H10O4
18	Calycosin	C16H12O5
19	Dihydrobiochanin A	C16H14O5
20	Vestitone	C16H14O5
21	Vestitol	C16H16O4
22	Neovestitol	C16H16O4
23	Formononetin *	C16H12O4
24	Demethyl medicarpin	C15H12O4
25	Medicarpin	C16H14O4
26	Biochanin A *	C16H12O5
27	5,4'-Dihydroxy-7-methoxyisoflavone	C16H12O5
28	3,9-Dimethoxypterocarpan	C17H16O4
Flavonois		
29	7-Hydroxy-6-methoxydihydroflavonol	C16H14O5
Neoflavonoides		
30	Dalbergin	C16H12O4
Polyprenylated benzophenones		
31	Guttiferone E/Xanthochymol	C38H50O6
32	Oblongifolin B	C38H50O6

* Em comparação com um padrão autêntico.

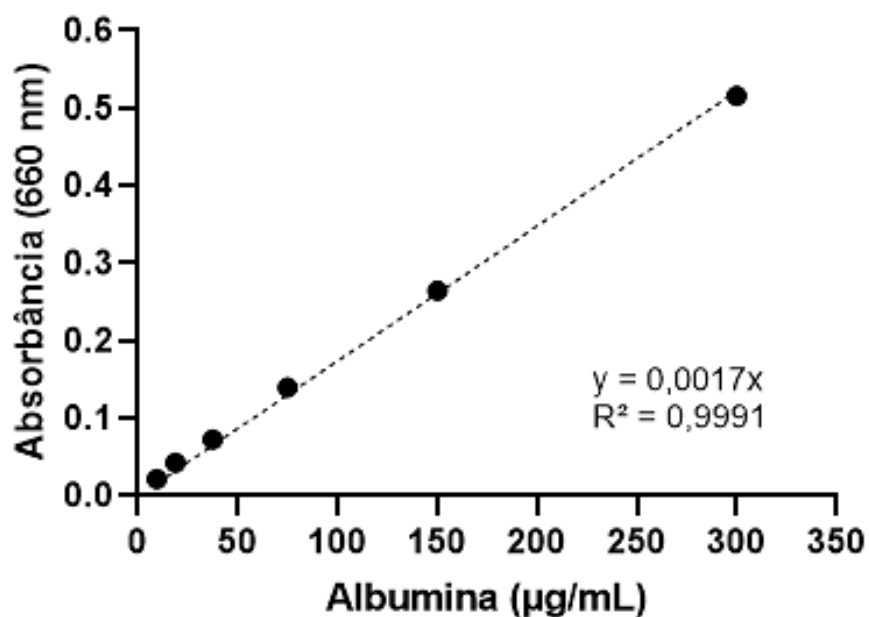
APÊNDICE B – Curvas de Calibração

Figura S1 - Curva de calibração de 1,1'3,3'-tetrametoxipropano em espectrofotômetro.



Fonte: autor (2024).

Figura S2 - Curva de calibração de albumina bovina sérica para dosagem de proteínas totais dos sobrenadantes de homogenatos dos tecidos analisados.



Fonte: autor (2024).

ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética no Uso de Animais

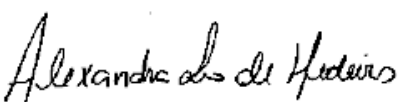


C E R T I F I C A D O

Certificamos que a proposta intitulada **“Avaliação dos efeitos da própolis vermelha brasileira coadministrada com metformina em sistema-modelo in vivo de obesidade e resistência à insulina.”**, registrada com o Protocolo CEUA/FCF/CAR: 27/2021, sob a responsabilidade do pesquisador Paulo Fernando Carlstrom, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado “ad referendum” pela Coordenadora da COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da UNESP no dia 30 de agosto de 2021.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Abril de 2024
Espécie/linhagem/raça	Camundongo isogênico C57BL6/J
Nº de animais	105
Peso/Idade	20 gramas - 6
Sexo	Machos
Origem	Anilab - Animais de Laboratório Criação e Comércio LTDA - Paulínia, São Paulo
Registro CIAEP	02.00082.2019

Araraquara, 30 de agosto de 2021.


 Profa. Dra. Alexandra Ivo de Medeiros
 Coordenadora da CEUA

ANEXO B -Registro na plataforma *SisGen*

For access to the Propolis sample, this research was registered under the number A305815, in the Brazilian National System Management of Genetic Heritage and Associated Traditional Knowledge (SisGen), according to Brazilian Law nº 13,123/2015.