

Efeito hipocolesterolêmico dos ácidos caféicos da própolis

ALVES, M.J.Q.F.*; MESQUITA, F.F.; SAKAGUTI, M.; TARDIVO, A.C.

Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências/Unesp/Botucatu - SP, CEP: 18618-000, Caixa Postal 510

*zeze@ibb.unesp.br

RESUMO: Os produtos naturais vêm sendo utilizados no tratamento de hiperlipidemia. Os produtos apícolas têm despertado o interesse do homem, entre eles destaca-se a própolis, coletada por abelhas e rica, entre outros constituintes, em polifenóis. Os maiores polifenóis da própolis são os flavonóides, acompanhados dos ácidos fenólicos, os quais têm poder antioxidante, podendo exercer ação protetora às lipoproteínas LDL-colesterol contra a lipoperoxidação. Assim, o presente trabalho avaliou se os ácidos caféicos da própolis botucatuense (Botucatu-SP) afetam os níveis de colesterol plasmático, em coelhos submetidos à dieta rica em colesterol. Os animais foram divididos em três grupos: C (n=2) que receberam ração comercial e água por todo o período e S (n=2) que receberam ração normal e água no primeiro período e ração suplementada e água nos segundo e terceiro períodos e S+T (n=5) receberam ração normal e água no primeiro período, ração suplementada e água no segundo período e ração suplementada e extrato rico em ácidos caféicos no terceiro período. Os ácidos caféicos foram administrados diluídos em água, estando na concentração de 0,05g ácidos caféicos mL⁻¹ kg⁻¹ animal. Semanalmente, após jejum de 14 horas, as amostras de sangue foram coletadas da veia marginal da orelha para determinação dos níveis plasmáticos de colesterol total e suas frações. Os ácidos caféicos da própolis reduziram a concentração plasmática de colesterol total em 30% (280 para 199 mg dL⁻¹) nos coelhos tratados com ácidos caféicos, enquanto que nos animais do grupo S esses níveis foram discretamente elevados (380 para 400 mg dL⁻¹). Os animais do grupo C mantiveram este parâmetro bioquímico na faixa de normalidade por todo o período (50 mg dL⁻¹). Portanto, concluímos que os ácidos caféicos exercem atividade inibitória no metabolismo do colesterol, podendo ser considerado uma substância de ação no combate da hipercolesterolemia.

Palavras-chave: Colesterol, ácidos caféicos, própolis

ABSTRACT: Hypocholesterolemic effect of propolis' caffeic acids. Natural products have been used in treatment of hypercholesterolemia. The bee products have been promoting up the man's interest, among them it stands out the propolis, collected by bees, rich in polyphenols. The biggest polyphenols of propolis was flavonoids and caffeic acids, which have antioxidant power, presenting the protective action to the lipoprotein LDL-cholesterol against the lipid peroxidation. Therefore, the present work was evaluated whether the caffeic acids of the Botucatu's propolis (Botucatu-SP) affect the levels of plasma cholesterol, in rabbits submitted to the rich diet in cholesterol. The animals were divided in three groups: C (n=2) they received commercial ration and water for the whole period; S (n=2) they received normal ration and water in the first period and supplemented ration and water in the second and third periods; S+T (n=5) they received normal ration and water in the first period, supplemented ration and water in the second period and supplemented ration and extract rich in caffeic acids in the third period. The caffeic acids were administered diluted in water, being in the concentration of 0.05g caffeic acid mL⁻¹ kg⁻¹ of animal. Weekly, after fast of 14 hours, the samples of blood were collected from the marginal vein of the ear for determination of the plasma levels of total cholesterol and their fractions. The caffeic acids of the propolis reduced the plasma concentration of total cholesterol in 30% (280 for 199 mg dL⁻¹) in the rabbits treated with flavonoids, while in the animals of the group S those levels were reduced discreetly (380 for 400 mg dL⁻¹). The animals of the group C maintained this biochemical parameter in the normality range during the whole period (50 mg dL⁻¹). Therefore, we concluded that the caffeic acids exert inhibitory activity in the metabolism of the cholesterol, being considered as a substance of action against the hypercholesterolemia.

Key words: Cholesterol, caffeic acids, propolis

Recebido para publicação em 28/09/2006

Aceito para publicação em 09/11/2007

INTRODUÇÃO

A associação entre hiperlipidemia e doença coronariana está bem estabelecida e se fundamenta principalmente no papel do colesterol durante o desenvolvimento da aterosclerose (Posadas-Romero, 1995). O acúmulo de LDL sobre a membrana endotelial torna-se fator de risco para a aterosclerose e doenças cardiovasculares (Goldstein & Brown, 1987) e a fração HDL (lipoproteína de alta densidade) impede este depósito (Millner, 1990; Whitney, 1994). Embora a patogênese dessa enfermidade seja complexa, um dos fatores determinantes reside na oxidação das LDL, induzindo o desenvolvimento da placa aterosclerótica (Steinberg et al., 1989).

A própolis, um produto apícola, tem despertado grande interesse dos pesquisadores, devido sua bioatividade em seres humanos, originando assim importante ramo da medicina denominado apiterapia (Stefano & Francesco, 2002; Karsten, 2001). A própolis é uma resina feita por abelhas operárias que para fazê-la usam materiais coletados de diversas plantas, sendo transportada para o interior das colméias para ser utilizada como meio de defesa (Koo & Park, 1996).

Devido à diversidade de plantas das quais as abelhas coletam o material para produção da própolis, há uma grande variabilidade dos compostos químicos encontrados nas própolis de diferentes regiões (Bankova et al., 2000), o que pode gerar diferentes atividades deste produto. Estudos comparando a própolis brasileira com a européia têm demonstrado esta variabilidade (Bankova, 2005; Kumazawa et al., 2003) e verificado a intensa atividade farmacológica da própolis brasileira (Marcucci & Bankova, 1999).

São conhecidos hoje mais de 180 compostos da própolis, sendo que os melhores identificados são os polifenóis, entre eles encontram os flavonóides, acompanhados dos ácidos fenólicos e ésteres fenólicos (Szewwezark & Goody, 1984; Midorikawa & Banskota, 2001; Uzel et al., 2005; Islã et al., 2004). Suas concentrações variam dependendo da flora da região de coleta e da variabilidade genética da abelha (Bankova et al., 1992; Koo & Park, 1996). Este apiterápico tem se destacado em função das inúmeras propriedades terapêuticas tais como: ação antimicrobiana, antiviral, antiinflamatória, imunomoduladora, hipoglicêmica, ação protetora em miocardiopatias em ratos (Uzel et al., 2005; Havsteen, 1983; Szewwezark & Goody, 1984; Chopra et al., 1995; Bankova et al., 1992; Tatefuji et al., 1996), dentre outras como antitumoral e antioxidante (Orsolich et al., 2005; Kimoto et al., 1999; Banskota et al., 2001; De Castro, 2001; Marquele et al., 2005).

Alguns pesquisadores apontam muito dos flavonóides como agentes anti-aterogênicos por serem importantes substâncias antioxidantes (Hertog

& Swwetnam, 1977; Mathiense et al., 1996). A quercitina, um dos muitos flavonóides encontrados na própolis, tem efeito antioxidante (Igarashi & Ohmuma, 1995): inibe a oxidação dos ácidos graxos polinsaturados dos fosfolipídios, que entram na constituição da LDL (Rimm et al., 1996). Trabalhos realizados em nosso laboratório revelaram que a própolis tem propriedade de reduzir em até 30% o colesterol total e a LDL plasmático, bem como aumentar a HDL em coelhos com hipercolesterolemia induzida (Fernandes et al., 2002a), dados que corroboram com os achados de Fernandes et al. (2002b), em ratos e de Fuliang et al. (2004) em animais com diabetes mellitus experimental. Por outro lado, Mesquita et al. (2007) demonstraram que a fração flavonoídica extraída da própolis (usada no trabalho de Fernandes et al., 2002b), foi eficiente em reduzir o colesterol e a LDL e aumentar a HDL em coelhos com hipercolesterolemia.

Os ácidos caféicos são fenóis encontrados em muitos produtos, e que têm sido isolados com muita frequência na própolis brasileira, dentre eles o cafeato de feniletila (CAPE), que é descrito como um potente inibidor específico da ativação do fator de transcrição nuclear NF kappa B e inibidor do tumor de pele induzido por formol (Natarajan et al., 1996). Por outro lado, testes feitos com extrato de própolis com e sem CAPE demonstraram que na presença deste há um efeito antioxidante bem mais acentuado (Russo et al., 2002), o que revela que estes ácidos são importantes na prevenção de doenças coronarianas. Valentova et al. (2003) também mostraram que os ácidos caféicos foram capazes de inibir a lipoperoxidação em fígado de ratos, podendo ser um tratamento importante no combate de doenças causadas por radicais livres, como a arterosclerose.

O presente trabalho teve por objetivo testar a fração de ácidos caféicos da própolis botucatuense (testada por Fernandes et al., 2002), sobre os níveis de colesterol plasmático e suas frações, em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), submetidos à dieta rica em colesterol.

MATERIAL E MÉTODO

Animais

Foram utilizados coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) machos, pesando em média 1.700 g, no início da experimentação. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central pertencente ao Campus de Botucatu/Unesp.

Própolis

A Própolis utilizada neste trabalho foi cedida pela Professora Silvia Funari do Setor de Apicultura, do Departamento de Produção, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP –

Botucatu, localizado na Fazenda Experimental Lageado, fonte semelhante à utilizada por Fernandes et al. (2002a).

Identificação e extração dos ácidos caféicos

Através das análises cromatográficas realizadas no Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento da Empresa Centroflora/Anidro, identificou-se que a própolis botucatuense tem os ácidos caféicos, sob a orientação das pesquisadoras Maria Célia H. Reimberg e Elizabeth Terán. No Departamento de Fitoquímica do CPQBA/Unicamp, realizou-se a extração destes ácidos sob a orientação da Dr^a Mary Ann Fóglio. Para esta extração utilizou-se a seguinte metodologia:

1. A própolis bruta foi diluída com diclorometano (CH_2Cl_2) através de agitação constante por 6 horas.

2. Evaporou-se o diclorometano utilizando-se rotavapor e verificou-se a massa para cálculo de rendimento final

3. Redissolveu-se a massa obtida em acetato de etila na proporção de 1g para 60 mL.

4. Transferiu-se para funil de separação e extraiu-se com hidróxido de sódio 1N (NaOH) na proporção de 1g para 60 mL com três repetições obtendo-se uma fase orgânica (desprezada) e uma fase de acetato.

5. Utilizando-se ácido clorídrico (HCl) reduziu-se o pH da fase orgânica até próximo de 5,0

6. Transferiu-se para funil de separação e reextraiu-se com diclorometano (CH_2Cl_2) na proporção de 1g para 60 mL com três repetições obtendo-se uma fase orgânica e uma fase aquosa (desprezada).

7. Através do rotavapor, evaporou-se o diclorometano da fase orgânica e verificou-se o rendimento.

Para confirmação da extração foi feita uma análise por Cromatografia de Camada Delgada, utilizando como amostra quatro fases da extração:

Pista 1: própolis bruta diluída com diclorometano

Pista 2: fase aquosa de acetato

Pista 3: fase orgânica de acetato

Pista 4: fase orgânica de diclorometano

Através da CCD observou-se que a amostra

da Pista 1 apresentava várias manchas, que indicavam todos os componentes extraídos (flavonóides, ácidos, caféicos, ácidos clorogênicos, etc.). Na pista 2 não foram observadas manchas, o que comprova que todos os compostos ficaram presentes na fase orgânica de acetato quando houve a separação. Isto pode ser confirmado observando-se a Pista 3 que apresentava algumas manchas indicando a presença de alguns compostos, entre eles os ácidos caféicos.

Na Pista 4 observaram-se três manchas mais evidentes, sendo que uma delas representa os ácidos caféicos, o que comprova que a extração foi eficiente.

Com a amostra inicial de 150g de própolis obteve-se um rendimento de 15g de solução concentrada de ácidos caféicos.

Toda a amostra de ácidos caféicos foi reservada em recipiente escuro para evitar contato com a luz e reservada em temperatura abaixo de 20°C para ser utilizada posteriormente no tratamento.

Essa amostra será diluída em etanol 70% para ser administrada nos animais na dosagem 0,05 g ácidos caféicos mL^{-1} dia⁻¹.

Instalação e Grupos Experimentais

O experimento foi instalado no biotério do Departamento de Fisiologia – IB/Unesp, Campus de Botucatu. Os coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) foram distribuídos aleatoriamente em 3 grupos experimentais (G1, G2 e G3), conforme a Tabela 1.

A ração suplementada foi formulada no Laboratório Experimental do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina /Unesp/Botucatu, a partir de ração normal, suplementada com gema de ovo, segundo descrito em Fernandes et al. (2002a) e em Mesquita et al. (2007).

Condução experimental

O controle da ingestão de ração foi diário e o peso dos animais foi obtido num intervalo de 15 dias. Semanalmente, após jejum de aproximadamente 14h, coletava-se sangue através da veia marginal da orelha dos animais, o qual era centrifugado e o plasma congelado para posteriores dosagens de colesterol total, LDL e HDL, através de kits enzimáticos.

TABELA 1. Delineamento experimental

Grupos Experimentais	1º Período (40 dias)	2º Período (40 dias)	3º Período (60 dias)
G1	Ração normal	Ração normal	Ração normal
G2	Ração normal	Ração Suplementada	Ração Suplementada
G3	Ração normal	Ração Suplementada	Ração Suplementada + tratamento

Delineamento Estatístico

Para cada variável foi utilizada análise multivariada de perfil (Morrison, 1990), visando comparar os grupos, em cada período, bem como o efeito de períodos para cada grupo. O nível de significância adotado foi de 0,05%.

RESULTADO

A Tabela 2 mostra os resultados obtidos com a evolução de ingestão diária média para os coelhos dos grupos G1 (ração normal), G2 (ração suplementada) e G3 (grupo tratado com a fração de ácidos cafêicos).

Os coelhos foram pesados quinzenalmente e os valores médios do aumento de peso corporal por grupo estão representados na Figura 1.

Nas Figuras 2, e 3 estão representados os resultados referentes aos valores médios de colesterol total. A Figura 2 mostra os valores médios ao longo de todo o experimento nos 3 grupos estudados e a Figura 3 representa os valores médios em cada período (1ª, 2ª e 3ª, segundo o protocolo da Tabela 1).

TABELA 2. Valores médios da ingestão diária de ração (em cada período, segundo o protocolo da Tabela 1), dos animais distribuídos nos 3 grupos experimentais.

Grupos experimentais	1º Período	2º Período	3º Período
G1	123,3	117,8	115,2
G2	125,4	103,0	89,16
G3	126,6	98,22	97,92

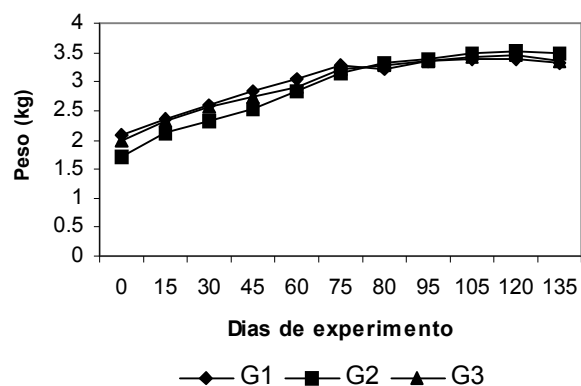


FIGURA 1. Valores médios do peso corporal por grupo. G1: ração normal, G2: ração suplementada, G3: ração suplementada + ácidos cafêicos. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$).

A Figura 3 mostra os valores médios de colesterol total nos três grupos, durante os três períodos experimentais. Todos os animais, no primeiro período apresentaram uma taxa média de colesterol de mais ou menos 50 mg dL^{-1} . Os coelhos do grupo G1 permaneceram com o nível de colesterol na faixa de normalidade (50 mg dL^{-1}), durante todo o experimento (2º e 3º períodos). Os animais dos grupos G2 (50 para 380 mg dL^{-1}) e G3 (50 para 280 mg dL^{-1}) elevaram significativamente ($p < 0,05$) o colesterol no 2º período (com ração suplementada), esse valor continuou alto (400 mg dL^{-1}) no 3º período. Nos animais de G2 e nos coelhos do grupo tratado registrou uma redução na hipocolesterolemia de 30%, após o tratamento com os ácidos cafêicos (de 280 para 199 mg dL^{-1}), a qual foi estatisticamente diferente ($p < 0,05$).

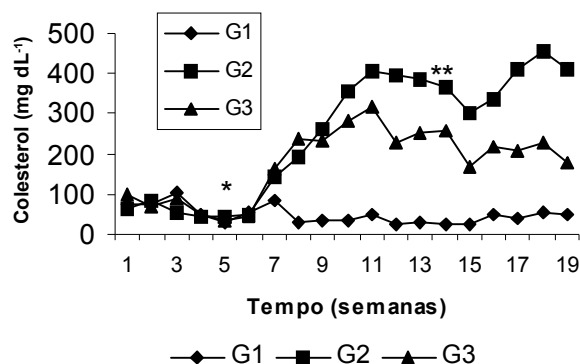


FIGURA 2. Valores de colesterol (mg dL^{-1}) plasmático nos animais dos grupos: Controle (G1), suplementado (G2) e tratado (G3). * início da suplementação **início do tratamento com ácidos cafêicos.

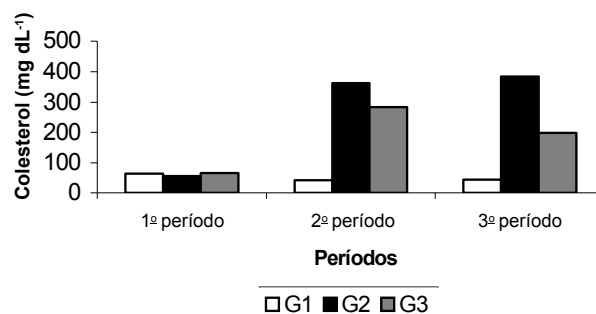


FIGURA 3. Valores médios de colesterol total (mg dL^{-1}) plasmático, nos 3 períodos de experimentação, dos animais dos grupos: sem suplementação (G1), suplementação (G2) e tratado (G3), nos 3 períodos experimentais. O 2º e o 3º períodos do G2 e G3 foram diferentes do 1º período ($p < 0,05$), e o 3º período de G3 foi estatisticamente diferente do 2º período desse grupo ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO

Observando os resultados de ingestão de ração (Tabela 1) nota-se que os animais de G2 e G3 diminuíram o consumo diário de ração em relação aos animais de G1, semelhante ao relatado por Mesquita et al. (2007). Estes resultados sugerem que provavelmente o confinamento pode reduzir a procura de alimento pelos animais. Além disso, essa redução mais acentuada para G2 e G3 pode ter ocorrido devido a ração suplementada apresentar alto valor calórico (Justo et al., 2002), pois estes animais apresentaram a mesma proporção de ganho de peso corporal que os animais de G1 (Figura 1).

As Figuras 2 e 3 mostram os valores médios de colesterol total para os três grupos. Após a suplementação (G2 e G3) nota-se aumento significativo ($p < 0,05$) no nível plasmático de colesterol total de $\pm 350\%$. Esses resultados estão de acordo com os de Pittas et al. (1999), Fernandes et al. (2002a) e Mesquita et al. (2007), os quais mostraram que a ração suplementada foi eficiente em causar a hipercolesterolemia experimental em coelhos. As Figuras 3 e 4 mostram que os animais tratados com ácidos caféticos (G3) apresentaram uma diminuição em $\pm 30\%$ no colesterol total ($p < 0,05\%$).

A própolis tem sido relatada como agente anti-aterogênico. E os principais componentes bioativos desta resina são os polifenóis, entre eles os flavonóides, os ácidos caféticos e os ésteres fenólicos (Midorikwa et al., 2001; Uzel et al., 2005). Fernandes et al. (2002a) sugeriram que o efeito hipolipidêmico encontrado nos coelhos tratados com a própolis pode ser explicado pelos flavonóides, os quais têm efeito antioxidante. (Hertog & Swwetnam, 1977; Havsteen, 2002). Na tentativa de comprovar tal hipótese, Mesquita et al. (2007) demonstraram que a própolis botucatuense tem 11% de flavonóides e que essa fração foi capaz de reduzir em 30% o nível de colesterol em coelhos com hipercolesterolemia induzida. Na tentativa de elucidar melhor o efeito hipolipidêmico da própolis, este trabalho teve por objetivo estudar o possível efeito dos ácidos caféticos. Os resultados aqui apresentados, mostram que os ácidos caféticos ($0,05 \text{ mg mL}^{-1} \text{ dia}^{-1}$), foram capazes de diminuir em 30% o nível de colesterol em coelhos com hipercolesterolemia experimental (Figuras 2 e 3), efeito semelhante ao encontrado para a própolis bruta (Fernandes et al., 2002a; Fernandes, et al., 2002b; Fulliang et al., 2004) e para a fração de flavonóides (Mesquita et al., 2007). Além disso, Yugarani et al. (1996) demonstraram que polifenóis naturais reduziram o nível de lipídeos em ratos alimentados com dietas ricas em gordura.

Sabe-se que a absorção intestinal dos polifenóis é muito baixa, os que os tornam com baixa biodisponibilidade. Entretanto, tem sido registrado biodisponibilidade para alguns desses polifenóis, tais

como a antiocianina da groselha preta, em humanos (Netzel et al., 2001) e a quercetina (Ross & Kasum, 2002). Sendo assim, pode ser que os ácidos caféticos tenham sido absorvidos pelo intestino dos coelhos com hipercolesterolemia, o que poderia justificar o efeito sistêmico desses ácidos sobre o nível de colesterol. Além disso, o efeito hipocolesterolêmico da fração de ácidos caféticos está de acordo aos achados de Russo et al. (2002) e Valentova et al. (2003), os quais sugerem que os ácidos caféticos podem ser um tratamento importante no combate de doenças causadas por radicais livres, como a arterosclerose, o que garante ainda mais a ação fitoterápica da própolis.

CONCLUSÃO

Conclui-se que os ácidos caféticos, apontados como antioxidantes, reduzem em 30% o colesterol total, podendo explicar, pelo menos em parte, o efeito hipocolesterolêmico encontrado para a própolis bruta.

AGRADECIMENTO

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- BANKOVA, V. Recent trends and important developments in propolis research. **Evidence-based complementary and Alternative Medicine**, v. 2 n.1, p.29-32, 2005.
- BANKOVA, V.; DYULGEROY, A. Própolis in Bulgaria and Mongolia: phenolic compounds and plant origin. **Apidologie**, v.23. p.79-85, 1992.
- BANKOVA, V.B.; DE CASTRO, S.L.; MARCUCCI, M.C. Própolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v.31, p. 3-15, 2000.
- BANSKOTA, A.H.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S. Recent progress in pharmacological research of propolis. **Phytotherapeutic Research**, v.15, n.7, p.561-71, 2001.
- CARRERO, P. Flavonid – induced ability of minimally modified low – density lipoproteins to support lymphocyte proliferation. **Biochemical Pharmacology**, v.55, n.7, p.1125-9, 1998.
- CHOPRA, S. Propolis protects against doxorubicin-induced myocardiopathy they in rats. **Experimental and Molecular Pathology**, v.63, n.3, p.190-8, 1995.
- DE CASTRO, S.L. Propolis: Biological and pharmacological activities therapeutic uses of this bee – product. **Annual Review of Biomedical Sciences**, v.3, p.49-83, 2001.
- FERNANDES, A.A.H. et al. Avaliação do colesterol plasmático em coelhos submetidos a hipercolesterolemia induzida e tratados com extrato etanólico de própolis. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.4, n.2, p.1-5, 2002a.
- FERNANDES, A.A.H. et al. Avaliação bioquímica do extrato etanólico da própolis **Revista Ciência Farmacêutica**, v.23, n.1, p.97-109, 2002b.

- FULIANG, H.U. et al. Effects os propolis on blood glucose, blood lipid and free radicals in rats with diabetes mellituss. **Pharmacological Research**, v.51, p.147-52, 2004.
- GOLDSTEIN, J.L.; BROWN, M.S. The low density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. **Annual Review Biochemistry**, v.46, p.897-930, 1987.
- HAVSTEEN, B.H. Flavonoids. A class of natural products of high pharmacological potency. **Biochemical Pharmacology**, v.32, p.1141-8, 1983.
- HAVSTEEN, B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoid. **Pharmacological Therapeutic**, v.96, n.2-3, p.67-202, 2002.
- HERTOG, M.G.; SWWETNAM, M. Antioxidant flavonols and ischemic heart disease in a Welsh population of mean: **The Caerphilly Study American Journal of Clinical Nutrition**, v.65, p.1489-94, 1977.
- IGARASHI, K.; OHMUMA, M. Effects of isorhamnetin, rhamnetin, and quercetin on the concentrations of cholesterol and lipoperoxide in the serum and liver and on the blood and liver antioxidative enzyme activities of rats. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v.59, p.595-601, 1995.
- ISLA, M.et al. Some chemical composition and biological activity of northern Argentine propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, n.4, p.1166-72, 2004.
- JUSTO, R.P. et al. Composição centesimal de rações usadas em estudo de hipercolesterolemia em coelhos. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNESP, 14., 2002, Presidente Prudente. **Anais eletrônicos...** Presidente Prudente, 2002.
- KARSTEN, M. Propolis-current and future medical uses. **American Bee Journal**, v. 141, n.7, p.507-10, 2001.
- KIMOTO, N. et al. Post – inhibition effects of a super critical extract of propolis in a rat two – stage carcinogenesis model in female. **Cancer Letters**, v. 147, p.221-7, 1999.
- KOO, M.H.; PARK, Y.K. Investigação do teor de flavonóides nas própolis comerciais. **Revista Brasileira de Apicultura**, v.6, n.13, p.6-7, 1996.
- KUMAZAWA, S.H. et al. Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.51, p.740-2, 2003.
- MARQUELE, F.D. et al. Assessment of the antioxidant activities of Brazilian extracts of propolis alone and in tropical pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.39, n.4-5, p.455-62, 2005.
- MARCUCCI, M.C.; BANKOVA, V.S. Chemical composition, plant origin and biological activity of Brazilian propolis. **Current Topic in Phytochemical**, v.2, p.115-23, 1999.
- MATHIENSE, L. et al. Inhibitor of low density lipoprotein oxidation by myricetin, a naturally occurring flavonoid. **Pharmacology and Toxicology**, v.78, p.143-6, 1996.
- MESQUITA, F. F. et al. Efeitos da fração flavonoídica da própolis sobre o metabolismo de colesterol, em coelhos com hipercolesterolemia experimental. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 9, n.1, p.44-50, 2007.
- MIDORIKAWA, K.; BANSKOTA, A.H. Liquid chromatography: mass spectrometry analysis of propolis. **Phytochemistry Analysis**, v.12, n.6, p.366-73, 2001.
- MILLNER, N.E. Raising high density lipoprotein cholesterol: the biochemical pharmacology of reverse cholesterol transport. **Biochemical Pharmacology**, v.40, p.403-10, 1990.
- MORRISON, D.F. **Multivariate Statistical Methods**. São Paulo: Mc Graw Hill. p.450, 1990.
- NATARAJAN, K. et al. **Proceedings of the National Academy Science of the United States of America**, n.93, n.17, p.9090-5, 1996.
- ORSOLIC, N.; KOSALEC, I. Synergistic antitumor effect of polyphenolic components of water soluble derivative of propolis against Ehrlich ascites tumor. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v.28 n.4, p.694-700, 2005.
- NETZEL, M. et al. Bioactive anthocyanins detected in human urine after ingestion of blackcurrant juice. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v.20, n.2, p.89-95, 2001.
- PITTAS, A.M.C.S., et al. Níveis de colesterol plasmáticos em coelhos submetidos à ração normal e suplementada. In: ENCONTRO REGIONAL DE BIOMEDICINA, 2., 1999, Botucatu. **Anais...** Botucatu, 1999. p.34.
- POSADAS-ROMERO, C. Cholesterol levels and prevalence of hypercholesterolemia in Mexican adult population. **Atherosclerosis**, v.118, p.275-84, 1995.
- RIMM, E.B. et al. Relation between intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and risk for coronary heart disease in male health professionals. **Annals of Internal Medicine**, v.125, p.384-9, 1996.
- ROSS, J.A.; KASUM, C.M. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. **Annual Review of Nutrition**, v.22, p.19-34, 2002.
- RUSSO, A.; LONGO, R.; VANELLA, A. Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. **Fitoterapia**, v.73, p.s21-s29, supl. 1, 2002.
- STEFANO, C.; FRANCESCO, C. Propolis an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, v.73, p.S1-6, 2002.
- STEINBERG, D. et al. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. **New England Journal Medicine**, v.320, p.915-24, 1989.
- SZEWWEZARK, E.H.; GOODY, G.F. Um estudo científico sobre a própolis. **Apicultura no Brasil**, v.3, p.28-9, 1984.
- TATEFUJI, T. et al. Isolation and identification compounds from Brazilian propolis which enhance macrophage spreading and mobility **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.19, n.7, p.966-70, 1996.
- UZEL, A. et al. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. **Microbiological Research**, v.160, n.2, p.189-95, 2005.
- VALENTOVA, K. et al. Antioxidant activity of extracts from the leaves of *Smilax asperifolia*. **European Journal of Nutrition**, v.42, n.1, p.61-6, 2003.
- WHITNEY, N.E. Nutrition and disorders of the blood vessel, heart, and lungs. In Understanding normal & clinical nutrition. 4 ed. Minneapolis: **West Publishing company**, v.27, p.879-909, 1994.
- YUGARANI, T. et al. Effects of polyphenolic natural products on the lipid profiles of rats fed high fat diets. **Lipids**, v.27, p.181-6, 1996.