



UFOP

Universidade Federal
de Ouro Preto

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**



Caracterização dos efeitos da suplementação nutricional com nanoesferas de própolis verde no perfil metabólico em camundongos submetidos a uma dieta hipoproteica

Ana Carolina Lima

Ouro Preto – MG

2022

Ana Carolina Lima

Caracterização dos efeitos da suplementação nutricional com nanoesferas de própolis verde no perfil metabólico em camundongos submetidos a uma dieta hipoproteica

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas - CIPHARMA, da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre. Área de concentração. “Fármacos, medicamentos e vacinas”. Linha de pesquisa: “Química e farmacologia das substâncias bioativas”.

Subárea: Farmacologia

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Sandra Aparecida Lima de Moura

Ouro Preto – MG

2022

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

L732c Lima, Ana Carolina.
Caracterização dos efeitos da suplementação nutricional com nanoesferas de própolis verde no perfil metabólico em camundongos submetidos a uma dieta hipoproteica. [manuscrito] / Ana Carolina Lima. - 2022.
75 f.: il.: color., tab..

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Aparecida Lima de Moura.
Coorientadora: Profa. Dra. Lucíola da Silva Barcelos.
Dissertação (Mestrado Acadêmico). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos.

1. Desnutrição hipoproteica. 2. Metabolismo Energético. 3. Suplementos Nutricionais. 4. Própolis. I. Barcelos, Lucíola da Silva. II. Moura, Sandra Aparecida Lima de. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 616.39

Bibliotecário(a) Responsável: Soraya Fernanda Ferreira e Souza - SIAPE: 1.763.787



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
REITORIA
ESCOLA DE FARMACIA
PROGRAMA DE POS-GRADUACAO EM CIENCIAS
FARMACEUTICAS



FOLHA DE APROVAÇÃO

Ana Carolina Lima

Caracterização dos efeitos da suplementação nutricional com nanoesferas de própolis verde no perfil metabólico em camundongos submetidos a uma dieta hipoproteica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 22 de setembro de 2022.

Membros da banca

Doutora Sandra Aparecida Lima de Moura - Orientadora - Universidade Federal de Ouro Preto
Doutora Lisandra Brandino de Oliveira - Universidade Federal de Alfenas
Doutor Leonardo Máximo Cardoso - Universidade Federal de Ouro Preto

Sandra Aparecida Lima de Moura, orientadora do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito no Repositório Institucional da UFOP em 10/12/2022.



Documento assinado eletronicamente por **Sandra Aparecida Lima de Moura, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 16/01/2023, às 12:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0455418** e o código CRC **C3F4D576**.

Este trabalho foi realizado sob a supervisão e orientação da Prof^a. Dr^a. Sandra Aparecida Lima de Moura e coorientação da Prof^a. Dr^a. Lucíola da Silva Barcelos.

Executado no Laboratório de Fisiologia Endócrina Cardiovascular (LFEC), no Instituto de Ciências Biológicas (ICEB II) 2^o andar/sala 46 – UFOP; Laboratório Multiusuário, na Escola de Farmácia, Bloco 3, sala 32 – UFOP; Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto.

Ouro Preto – MG

2022

Este trabalho foi financiado pelos órgãos citados abaixo:

FAPEMIG – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

PROPP – Pró Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação da Universidade Federal de Ouro Preto

APICRIM – Grupo de Pesquisa coordenado pela Prof.^a Dr.^a Sandra Aparecida Lima de Moura

BIOCLIN – Fábrica Quibasa Bioclin

UFOP – Universidade Federal de Ouro Preto

SAMARCO – Samarco Mineração S.a.

PPG CiPharma – Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas/ Escola de Farmácia/ EFAR.



UFOP

**Universidade Federal
de Ouro Preto**



AGRADECIMENTO

No momento em que mais um ciclo se completa e todos os esforços resultam na concretização de mais uma etapa, não poderia deixar de agradecer a todos que contribuíram para a obtenção deste título. Ninguém caminha sozinho! A necessidade do outro é uma constante na vida humana, sempre é preciso um olhar de apoio, uma palavra de incentivo, um ensinamento, um puxão de orelha, um gesto de compreensão, uma atitude de amor.

Agradeço a Deus e toda espiritualidade existente em primeiro, pela vida e saúde, por não me deixar desanimar nos momentos mais difíceis dessa caminhada em meio a uma pandemia mundial.

À minha querida orientadora, Prof.^a Dr.^a Sandra Aparecida Lima de Moura, essencial na minha formação acadêmica e humana, a quem admiro pelo profissionalismo, força, garra e pela simplicidade. Obrigada por acreditar em meu potencial, pelas palavras de incentivo, ensinamentos, apoio, amizade e por me orientar tão compreensivamente nessa jornada.

Aos meus pais, por serem minha base de amor e dedicação e os maiores incentivadores dos meus projetos.

Ao meu grande amigo Natanael Ribeiro dos Santos, com quem compartilhei essa jornada.

Agradeço a todos os meus amigos (as) pelo apoio e incentivo, em especial, aos do laboratório de Fisiologia Endócrina Cardiovascular da Universidade Federal de Ouro Preto: muito obrigada pela acolhida, carinho e disponibilidade. A todos os membros do grupo de pesquisas APICRIM, de quem adquiri conhecimentos e que a mim agregaram valor.

Aos membros da banca examinadora, por dedicaram parte do seu tempo na avaliação deste trabalho e pelas excelentes contribuições realizadas.

Aos membros do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFOP.

Aos órgãos de fomento CAPES, CNPq, FAPEMIG e PROPP.

A todos, os meus mais sinceros agradecimentos.

*“Todas as experiências são sagradas! Honre cada passo do caminho que te
permite chegar à evolução”.*

(Autor Desconhecido)

RESUMO

A desnutrição é considerada um fator agravante para o desenvolvimento de alterações metabólicas no ambiente clínico levando a graves condições patológicas. Em função disso, há uma busca por novas estratégias terapêuticas com o intuito de modular os processos metabólicos. Dentre essas estratégias, o uso da nanotecnologia utilizando a própolis verde vem ganhando grande visibilidade e é necessário saber em que medida essa tecnologia é capaz de potencializar o uso do extrato aquoso da própolis verde como estratégia de combate à desnutrição hipoproteica e seus efeitos. Este trabalho teve como objetivo caracterizar os efeitos da suplementação nutricional com nanoesferas de própolis verde no perfil metabólico em camundongos submetidos à dieta hipoproteica. Para tanto, utilizou-se um modelo animal de desnutrição hipoproteica no qual 64 camundongos da linhagem Swiss fêmeas com 6 semanas de vida foram divididos em 8 grupos de maneira aleatória e submetidos a dietas normoproteica e hipoproteica. A dieta normoproteica possuía 12% de proteína, enquanto a dieta hipoproteica possuía 3% de proteína. A partir da 10^a semana de vida, iniciou-se o tratamento via oral com nanoesferas contendo extrato aquoso da própolis verde, na dose de 500 mg/kg por dia, aos grupos tratados. Ao realizar a avaliação de parâmetros importantes, como a média de peso e os níveis séricos de proteínas observou-se que o modelo experimental de desnutrição hipoproteica empregado mostrou-se eficiente. O tratamento também reduziu a atividade bioquímica das enzimas presentes na função hepática independente do estado nutricional dos animais. Em relação ao perfil lipídico o tratamento foi capaz de reduzir todos os marcadores independente do estado nutricional e do tempo de tratamento. Os resultados evidenciaram que as nanoesferas de extrato aquoso da própolis verde apresentaram efeito hepatoprotetor nos animais tratados. O tratamento com as nanoesferas reduziu a expansão das lesões hepáticas revelando algumas ilhas de hepatócitos íntegros nos grupos hipoproteicos tratados, diferentemente dos grupos não tratados, cujo parênquima hepático estava totalmente comprometido. Concluiu-se que a tecnologia empregada com o uso de nanoesferas de extrato aquoso de própolis verde pode constituir-se em uma promissora estratégia alternativa na prevenção e tratamento dos efeitos maléficos decorrentes da desnutrição contribuindo assim para proposição de novas estratégias de prevenção e tratamento dessa importante questão de saúde pública.

Palavras chaves: Desnutrição. Desnutrição hipoproteica. Metabolismo. Nanoesferas aquosas. Própolis verde.

ABSTRACT

Malnutrition is considered an aggravating factor for the development of metabolic alterations in the clinical setting leading to serious pathological conditions. Because of this, there is a search for new therapeutic strategies aiming to modulate metabolic processes. Among these strategies, the use of nanotechnology using green propolis has gained great visibility and it is necessary to know to what extent this technology is able to enhance the use of the aqueous extract of green propolis as a strategy to combat hypoprotein malnutrition and its effects. This study aimed to characterize the effects of nutritional supplementation with nanospheres of green propolis on the metabolic profile in mice submitted to a hypoproteic diet. An animal model of hypoprotein malnutrition was used in which 64 6-week-old Swiss mice were randomly divided into 8 groups and submitted to normoprotein and hypoprotein diets. The normoprotein diet contained 12% protein, while the hypoprotein diet contained 3% protein. From the 10th week of life on, oral treatment with nanospheres containing aqueous extract of green propolis, at a dose of 500 mg/kg per day, was started for the DNT and DHT treated groups, at two different times, 7 and 14 days. When evaluating important parameters, weight gain was observed in all treated models, regardless of nutritional status. The treatment also reduced the enzymatic activity of ALT, AST, and FA in both treatment times, regardless of the nutritional status of the animals. Regarding GGT, the 7-day treatment was more efficient in the hypoproteic models, but the longer treatment was able to reduce GGT activity in all models, regardless of the nutritional status of animals. Regarding the lipid profile, it was found that the results may have suffered interference from the type of feed chosen for the diet, but even so, the treatment was able to reduce all markers of the lipid profile, regardless of nutritional status and treatment time. The results showed that the nanospheres of aqueous extract of green propolis had a hepatoprotective effect in treated animals in both times, although it was not able to prevent the manifestation of lesions. The hypoglycemic effect of the treatment was also evident. It was concluded that the technology of nanospheres of aqueous extract of green propolis may be a promising alternative strategy in the prevention and treatment of the harmful effects of malnutrition.

Keywords: Malnutrition. Hypoprotein malnutrition. Metabolism. Watery nanospheres. Green propolis

LISTAS DE SIGLAS

ONU -	Organização das Nações Unidas
FAO -	Fundo das nações Unidas para Alimentação e Agricultura
FIDA -	Fundo Internacional para o Desenvolvimento Agrícola
PMA -	Programa Mundial de Alimento das Nações Unidas
OMS -	Organização Mundial de Saúde
CCA -	Centro de Ciência Animal
NIH -	Instituto Nacional de Saúde
ALT -	Alanina aminotransferase
ASTL -	Aspartato aminotransferase
FA -	Fosfatase Alcalina
GGT -	Gama Glutamil Transferase
HDL -	Lipoproteína de alta densidade
PT -	Proteínas Totais
DNC -	Dieta Normoproteica Controle
DNT -	Dieta Normoproteica Tratado
DHC -	Dieta Hipoproteica Controle
DHT -	Dieta Hipoproteia Tratado
ELISA -	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
μL -	Microlitro
% -	Porcentagem
°C -	Graus Celsius

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração de flavonoides no extrato aquoso de própolis verde em triplicata.....	46
Tabela 2 - Caracterização das nanoesferas de própolis verde.	46
Tabela 3 - Resumo das análises bioquímicas dos animais de experimentação.....	67

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 – (A) <i>Apis Mellifera</i> coletando resina na <i>Baccharis dracunculifolia</i> (Asteraceae); (B) Própolis verde bruta	22
Figura 2 - Coletor de própolis inteligente (CPI)	31
Figura 3 - Metodologia dinâmica para obtenção do extrato aquoso de própolis verde.	32
Figura 4 - (A) Caixa contendo maravalha; (B) Camundongos da Linhagem Swiss fêmeas	35
Figura 5 - Delineamento experimental	35
Figura 6 - Linha do tempo do período experimental com os principais procedimentos.	37
Figura 7 - Própolis verde no coletor de própolis inteligente.....	45
Figura 8 - Dosagem de proteínas totais nos níveis séricos em animais dos grupos controle e tratado com 500/mg/kg/dia de nanoesferas de própolis verde. O nível circulante da enzima nos animais dos grupos tratado foi reduzido apresentando diferenças significativas entre eles nos tempos de 7 e 14 dias em relação aos grupos controle as comparações foram observadas entre os grupos DNC vs. DHC e DNT vs. DHT. Os resultados foram expressos em múltiplas comparações (n=8), * $P < 0.001$..	49
Figura 9 – Dosagem sérica de Alanina Aminotransferase (ALT) em animais dos grupos controle e tratado com 500/mg/kg/dia de nanoesferas de própolis verde. O nível circulante da enzima nos animais dos grupos tratado foi reduzido apresentando diferenças significativas entre eles nos tempos de 7 e 14 dias em relação aos grupos controle as comparações foram observadas entre os DNC vs. DHC e DNT vs. DHT. Os resultados foram expressos em múltiplas comparações (n=8), * $P < 0.001$	50
Figura 10 - Dosagem de Aspartato Aminotransferase (AST) em animais dos grupos controle e tratado com 500/mg/kg/dia por 7 e 14 dias. O nível circulante da enzima nos animais dos grupos tratado foi reduzido apresentando diferenças significativas entre eles nos tempos de 7 e 14 dias em relação aos grupos controle as comparações foram observadas entre os DNC vs. DHC e DNT vs. DHT. Os resultados foram expressos em múltiplas comparações (n=8), * $P < 0.001$	51
Figura 11 - Dosagem de Gama Glutamil Transferase (GGT) em animais dos grupos controle e tratado com 500/mg/kg/dia por 7 e 14 dias. O nível circulante da enzima nos animais dos grupos tratado foi reduzido apresentando diferenças significativas entre eles nos tempos de 7 e 14 dias em relação aos grupos controle as comparações foram observadas entre os grupos DNC vs. DHC e DNT vs. DHT. Os resultados foram expressos em múltiplas comparações (n=8), * $P < 0.001$	52
Figura 12 - Dosagem de Fosfatase Alcalina (FA) em animais dos grupos controle e tratado com 500/mg/kg/dia por 7 e 14 dias. O nível circulante da enzima nos animais dos grupos tratado foi reduzido apresentando diferenças significativas entre eles nos	

tempos de 7 e 14 dias em relação aos grupos controle as comparações foram observadas entre os grupos DNC vs. DHC e DNT vs. DHT. Os resultados foram expressos em múltiplas comparações (n=8), * $P < 0.001$53

Figura 13 - Dosagem de Lipídeos Totais (LP) em animais dos grupos controle e tratado com 500/mg/kg/dia por 7 e 14 dias. O nível de lipídeos totais nos animais dos grupos tratado foi reduzido apresentando diferenças significativas entre eles nos tempos de 7 e 14 dias em relação aos grupos controle as comparações foram observadas entre os grupos DNC vs. DHC e DNT vs. DHT. Os resultados foram expressos em múltiplas comparações (n=8), * $P < 0.001$55

Figura 14 - Dosagem de Triglicérides em animais dos grupos controles e tratados com 500/mg/kg/dia por 7 e 14 dias. O nível de triglicérides nos animais dos grupos tratado foi reduzido apresentando diferenças significativas entre eles nos tempos de 7 e 14 dias em relação aos grupos controle as comparações foram observadas entre os grupos DNC vs. DHC e DNT vs. DHT. Os resultados foram expressos em múltiplas comparações (n=8), * $P < 0.001$56

Figura 15 - Dosagem de HDL em animais dos grupos controles e tratados com 500/mg/kg/dia por 7 e 14 dias. O nível circulante de HDL nos animais dos grupos tratado foi reduzido apresentando diferenças significativas entre eles nos tempos de 7 e 14 dias em relação aos grupos controle as comparações foram observadas entre os grupos DNC vs. DHC e DNT vs. DHT. Os resultados foram expressos em múltiplas comparações (n=8), * $P < 0.001$56

Figura 16 - A dosagem de glicose nos tempos de 7 dias e 14 dia nos animais dos grupos tratado foi reduzido apresentando diferenças significativas entre eles nos tempos de 7 e 14 dias em relação aos grupos controle as comparações foram observadas entre os grupos DNC vs. DHC e DNT vs. DHT. Os resultados foram expressos em múltiplas comparações (n=8), * $P < 0.001$58

Figura 17 - Cortes histológicos de Fígado evidenciando alterações histopatológicas degenerativas e vasculares no parênquima hepático. Fig. **(A)**: grupo DNC tempo de 7 dias; Fig. **(B)**: grupo DNC tempo de 14 dias; Fig. **(C)**: grupo DNT tempo de 7 dias; Fig. **(D)**: grupo DNT tempo de 14 dias; Fig. **(E)**: grupo DHC tempo de 7 dias; Fig. **(F)**: grupo DHC tempo de 14 dias; Fig. **(G)**: grupo DHC tempo de 7 dias; Fig. **(H)**: grupo DHC tempo de 14 dias. (*)=Tríade portal; (DH)=Degeneração Hidrópica; (E)=Esteatose; (VC)= Veia Centrolobular. Coloração H/E, aumento de 10X. Insete: Zoom em aumento de 20X.60

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	EMBASAMENTO TEÓRICO	19
2.1	NECESSIDADE NUTRICIONAL E ENERGÉTICA	19
2.2	CORRELAÇÃO DA DEFICIÊNCIA PROTEICA COM SEUS ASPECTOS METABÓLICOS	19
2.3	TRATAMENTO CONVENCIONAL DAS DEFICIÊNCIAS NUTRICIONAIS E NOVAS ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS	21
2.4	A PRÓPOLIS VERDE	22
2.5	EMULSÕES E NANOESFERAS	23
3	OBJETIVOS	26
3.1	Objetivo Geral	26
3.2	Objetivos Específicos	26
4	JUSTIFICATIVA	27
5	MATERIAIS E MÉTODOS	28
5.1	REAGENTES E SOLUÇÕES	28
5.2	EQUIPAMENTOS	29
6	METODOLOGIA	31
6.1	COLETA DA PRÓPOLIS E OBTENÇÃO DOS EXTRATOS	31
6.1.1	Obtenção do extrato aquoso de própolis verde	32
6.1.2	Avaliação da presença de flavonoides no extrato aquoso de própolis verde ..	33
6.1.3	Obtenção das nanoesferas de extrato de própolis verde e caracterização das nanoesferas	34
6.2	ANIMAIS	34
6.3	MODELO EXPERIMENTAL	35
6.4	ALIMENTAÇÃO E DIETA COM RESTRIÇÃO DE PROTEÍNA	38
6.5	TRATAMENTO	39
6.6	AVALIAÇÃO DO PESO CORPORAL	39
6.7	EUTANÁSIA	40
6.8	PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	40
6.8.1	Análises bioquímicas	40
6.8.2	Análise histopatológica do fígado	42
6.8.3	Leitor panoramic scanner	43
6.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
7	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
7.1	PROCESSO DE SELEÇÃO E ANÁLISE DA PRÓPOLIS VERDE BRUTA	44
7.3	CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS PRESENTES NAS NANOESFERAS DE PRÓPOLIS VERDE	46
7.4	ANÁLISE Da funcionalidade das dietas normoproteica e hipoproteica	47
7.5	PROTEÍNAS PRESENTES NA CIRCULAÇÃO SANGUÍNEA	48
7.6	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA FUNÇÃO HEPÁTICA	50
7.6.1	Alanina aminotransferase (ALT)	50
7.6.2	Aspartato aminotransferase (AST)	50
7.6.3	Gama Glutamil Transferase (GGT)	52
7.6.4	Fosfatase alcalina	53
7.7	LIPIDOGRAMA	54
7.7.1	Lipídeos totais	54
7.7.2	Triglicérides	55
7.7.3	HDL – Lipoproteína de Alta Densidade	56

7.8	GLICOSE.....	57
8	RESUMO DOS RESULTADOS	63
9	CONSIDERAÇÕES FINAIS	63
	ANEXO C - Certificado de Aprovação da comissão de ética no uso de animais (CEUA).....	74
	ANEXO D - Ingredientes receita ain93 para roedores comercializada pela pragsoluções	75

1 INTRODUÇÃO

A desnutrição pode ser caracterizada por um desequilíbrio provocado pela insuficiência de nutrientes basais essenciais para a sobrevivência, manutenção do metabolismo, crescimento e reprodução (MORGANE et al., 2002).

A desnutrição pode ser classificada como primária, quando decorre de dieta inadequada, com baixos índices de vitaminas, sais minerais, carboidratos, lipídeos e proteínas. Entretanto, a desnutrição também pode ser secundária quando, mesmo diante do consumo alimentar adequado, o organismo não aproveita os nutrientes e energia disponibilizados (SOARES et al., 2013).

Quando a dieta é carente de proteínas, ela pode dar origem à desnutrição hipoproteica, provocando perda de massa corpórea em virtude do catabolismo das proteínas, necessária nos processos de manutenção do metabolismo (BARBOSA, 2008; MOLINA; PELISSARI 2009; AMARO,2016).

Para proteger os órgãos mais vitais, tais como o cérebro, coração e intestino, o organismo consome as reservas de gordura subcutânea. Tudo isso trata-se de um esforço adaptativo do organismo para manter a homeostase e equilíbrio fisiológico. Entretanto, o fígado pode ser comprometido em casos mais graves, comprometendo a adaptabilidade. Há a redução drástica de proteínas plasmáticas, tais como a albumina e o nível de aminoácidos (SAWAYA, 2019).

Embora possa acometer grupos de todas as idades, a desnutrição afeta principalmente mulheres nos países em desenvolvimento. Relatórios mundiais apontam ainda que mais de 2 bilhões de pessoas sofrem com a deficiência de nutrientes apresentando um grau preocupante de desnutrição que pode variar desde as formas mais leves às mais severas e provocar efeitos irreversíveis, a depender da fase de desenvolvimento do indivíduo (UNICEF, 2021).

A ausência de nutrientes altera o equilíbrio do metabolismo e desencadeia uma série de alterações bioquímicas (MURRAY et al., 2013). Neste sentido podemos destacar a atuação das proteínas importantes para a estruturação dos tecidos e órgãos, atuando com grande importância na síntese hormonal, enzimática e está presente na maioria das reações metabólicas sendo indispensáveis para o funcionamento do organismo (NELSON, 2014; MARZOCCO, 2015).

Para fazer frente aos efeitos da desnutrição hipoproteica, tem sido realizado

estudos multidisciplinares com extrato de própolis verde com a finalidade de prover alternativas suplementares para o tratamento desse grupo de indivíduos. Desse modo, busca-se ampliar seu bem-estar, reduzir os efeitos colaterais da desnutrição hipoproteica e aumentar a eficácia da resposta imunológica, apesar do eventual déficit proteico do organismo afetado (LUSTOSA et al., 2008).

Recentemente, a terapia intensiva moderna tem aplicado a chamada "suplementação terapêutica" no tratamento de pacientes internados com quadro de desnutrição. A suplementação terapêutica preocupa-se em administrar nutrientes ativos capazes de reduzir os danos decorrentes da oxidação. Busca, também, modular as alterações metabólicas e aumentar a tolerância do organismo à alimentação (HEGAZI, 2011).

A própolis verde vem ganhando grande visibilidade medicina popular sendo típica do território brasileiro, é produzida a partir da coleta da resina dos brotos e tricomas glandulares da *Baccharis draunculifolia*, "Alecrim-do-Campo" e processada pelas abelhas africanizadas (*Apis mellifera*), com o objetivo de selar a colmeia, esterilizar o ambiente interno e impedir o desenvolvimento de agentes microbianos ou insetos invasores prejudiciais à sobrevivência do grupo (MIRANDA et al., 2019). A própolis verde apresenta inúmeros efeitos biológicos, tais como atividade imunoestimulante, imunomoduladora, hepatoprotetora, antitumoral, cicatrizante, antioxidante e anti-inflamatória (FISCHER, 2008).

A maior parte das propriedades da própolis, em geral, já era bastante conhecida, porém apenas recentemente passou a ser cientificamente estudada e avaliada (VECCHI; DRAGO, 2007). Sua composição química pode chegar a mais de 350 (trezentos e cinquenta) compostos que variam bastante, dependendo da região, clima e espécie de abelhas (FAROOQUI, 2010).

No Brasil existem três tipos principais de própolis, a própolis vermelha sendo conhecida por sua maior atividade antimicrobiana e antioxidante. A própolis marrom que não tem composição de uma planta específica, mas é conhecida por suas atividades antivirais. A mais popular e estudada atualmente é a própolis verde, conhecida por sua capacidade de modulação do sistema imunológico e do metabolismo (FRANÇA et al., 2020). A suposição de modulação do metabolismo e efeito hepatoprotetor que será empregada nesta pesquisa, em razão dos objetivos definidos.

Sabe-se, entretanto, que os extratos de própolis possuem uma boa absorção pelo organismo, e suas substâncias apresentam importantes efeitos antioxidantes e hepatoprotetores (MANI, 2006; LUSTOSA, 2008). Entre as principais substâncias identificadas no extrato estão os derivados do ácido clorogênico, ácido cinâmico, ácido p-cumárico, baccarina, drupanina e artemillin C. As duas classes de substâncias já demonstraram exercer diversas ações biológicas, tais como propriedades hepatoprotetoras, antitumorais, antioxidantes, indutoras de apoptose e imunomoduladoras (MOURA et al., 2011).

Existem também duas formas mais comuns de extrair as substâncias químicas da própolis. Uma delas é por meio do extrato hidroalcolico, que emprega etanol como solvente. Entretanto, o etanol possui restrições de uso para crianças e pessoas sensíveis a este solvente. Como alternativa temos o extrato aquoso, onde emprega-se água como solvente sendo menos agressivo, mas, ainda assim, capaz de extrair os compostos químicos da própolis responsáveis por exercer variados efeitos no metabolismo (MIGUEL et al., 2014).

Uma nova estratégia terapêutica fundamentada em nanobiotecnologia tem se mostrado uma alternativa viável para reduzir problemas relacionados à eficácia e à degradação de compostos bioativos naturais que, na maioria das vezes, são instáveis (BAJERSKI et al., 2016). As nanoesferas podem ser utilizadas para produzir formulações capazes de conferir-lhes estabilidade cinética e possuem grande potencial para melhorar a absorção de substâncias pelo organismo. Esse sistema apresenta inúmeras vantagens para a administração de fármacos, incluindo a proteção das moléculas ativas contra a degradação em meio fisiológico e liberação controlada da substância ativa no sítio de ação (CARLUCCI, 2009).

O uso de nanoesferas, contendo extrato aquoso de própolis, surge como uma alternativa suplementar natural, de custo reduzido e de ação mais rápida, visto que maximiza o aproveitamento terapêutico das substâncias moleculares. Possuem diversas vantagens em relação aos veículos tradicionais, e são capazes de veicular fármacos lipofílicos em um sistema disperso aquoso devido ao seu tamanho reduzido, que proporciona uma elevada superfície de contato com as membranas biológicas, favorecendo sua absorção (TADROS et al., 2009).

As alterações metabólicas decorrentes da desnutrição hipoproteica têm despertado o interesse da comunidade científica devido à associação com doenças

que podem se tornar crônicas e, até mesmo, levar a óbito. Tais alterações metabólicas são mais prevalentes em mulheres e podem estar relacionadas ao estilo de vida (OLIVEIRA, 2020).

Diante desse cenário, despertou-se para a seguinte questão de pesquisa: em que medida a nanotecnologia é capaz de potencializar o uso do extrato aquoso da própolis verde como estratégia de combate à desnutrição hipoproteica? Uma vez que diante de questões sociais desafiadoras, a alimentação com restrição proteica tem ganhado grande impacto na vida de indivíduos. Em face dessa pergunta norteadora, o presente trabalho propôs investigar os efeitos da suplementação oral em camundongos da linhagem Swiss com nanoesferas de extrato aquoso da própolis verde no metabolismo de animais com desnutrição hipoproteica.

Os resultados obtidos poderão servir de suporte a futuros ensaios farmacológicos que possibilitem o desenvolvimento de estratégias suplementares eficazes e que possam auxiliar no tratamento de doenças metabólicas e/ou desnutrição hipoproteica.

2 EMBASAMENTO TEÓRICO

Neste capítulo serão apresentadas as bases teóricas que deram sustentáculo à nossa pesquisa e subsídios para os experimentos.

2.1 NECESSIDADE NUTRICIONAL E ENERGÉTICA

A desnutrição pode ser considerada uma condição causada pela deficiência ou má ingestão de nutrientes essenciais para o funcionamento adequado do organismo, podendo ser desenvolvida por vários fatores sendo eles na má alimentação ou pela incapacidade de absorção dos nutrientes ingeridos (CUPPARI, 2002).

Neste contexto, a carência de proteínas e minerais essenciais causadas pela desnutrição vem se destacando devido a sua grande importância metabólica no organismo. Uma dieta deficiente de proteínas, principalmente as que são compostas por aminoácidos essenciais, dependendo do estágio de desenvolvimento do indivíduo, pode levar a sérias complicações e alterações fisiopatológicas no metabolismo, o que resulta em danos bioquímicos, físicos e prejuízos funcionais (GURMINI et al., 2005).

As alterações metabólicas apresentam características específicas, tais como abdômen distendido, diminuição da massa corpórea e diminuição da força muscular, podendo levar a complicações mais severas em aproximadamente 90% dos pacientes acometidos (VARELLA, 2017).

2.2 CORRELAÇÃO DA DEFICIÊNCIA PROTEICA COM SEUS ASPECTOS METABÓLICOS

No que se refere às situações de deficiência proteica, o sistema imunológico responde rapidamente, sendo o primeiro a desenvolver mecanismos da primeira linha de defesa do organismo, alterando diversas vias metabólicas (GOURION, 2014).

Sendo assim a desnutrição proteica está atrelada à baixa ingestão de nutrientes, o que acarreta um déficit de aminoácidos, carboidratos e minerais no organismo. Essa situação debilita o metabolismo, podendo levar a importantes alterações patológicas (KALANTAR-KAZEHI et al., 2004).

De acordo com Saker (2009), dessa forma quando um indivíduo saudável passa por um tempo de privação alimentar, ocorre a oxidação do estoque de gordura,

e isso contribui para a diminuição do catabolismo proteico e agrava ainda mais o estado nutricional na associação de deficiência proteica e síndromes metabólicas.

Ademais, Ribeiro Filho (2006) demonstrou que pacientes com grande variedade de desordens, doenças intestinais crônicas, doenças renais crônicas, traumas, infarto e neoplasias têm uma elevada taxa de ocorrência alterações metabólicas quando comparados a grupos de controle saudáveis.

Em pacientes com doenças gastrointestinais, é comum associar o estado nutricional às alterações metabólicas. As alterações metabólicas podem estar relacionadas com a deficiência de um único nutriente ou vários deles (COLLARES; PAULINO, 2006). A deficiência proteica tem despertado a atenção dos pesquisadores há muito tempo, principalmente em pacientes hospitalizados, em razão de provocar diversos efeitos adversos ao paciente. Um desses efeitos é a limitação da capacidade de desenvolvimento da resposta inflamatória protetora (MOYNIHAN; PETERSEN, 2006).

Estudos sobre as regulações proteicas e nutricionais do metabolismo vêm sendo desenvolvidos e utilizados em aplicações práticas. Bertolini (2005) realizou descobertas muito importantes a partir de modelos Swiss de 21 dias. Ao submeter os modelos à desnutrição proteica no período do desenvolvimento embrionário e durante a fase da lactação, ele constatou a presença de alterações metabólicas e o desenvolvimento de fatores de risco para doenças na fase adulta da vida.

Porém, o experimento de Bertolini (2005) também indica que, mesmo sob forte privação de proteínas, o organismo se esforça para preservar ao máximo alguns órgãos, sobretudo o sistema hepático. Mesmo assim, foram notados indícios de que houve alterações nos processos de metabolização hepática.

Diante dessa situação de desequilíbrio, o fígado sofre diversas alterações, a começar pela redução da glicemia e albuminemia. Isso pode ocorrer em razão da escassez de substratos capazes de sintetizar a albumina. Madani e colaboradores (2000) constataram que uma dieta pobre em proteínas compromete o metabolismo lipídico dos modelos animais.

Em relação ao colesterol plasmático, Nassir e colaboradores (1997) já havia constatado que modelos alimentados com baixa concentração de caseína também apresentaram queda na concentração de LDL na concentração sanguínea. O "fígado com esteatose" seria o resultado da diminuição na síntese de apolipoproteína do VLDL nesse órgão. Já em relação ao LDL, acredita-se que a escassez de uma proteína

específica pode ter afetado a expressão de receptores de LDL, elevando a concentração desse tipo de colesterol no plasma (MADANI et al., 1997).

Por fim, Oliveira e colaboradores (2000) perceberam que o aumento de lipídios no plasma pode ocasionar a peroxidação desses elementos, predispondo o organismo ao Diabetes mellitus tipo II, arteriosclerose, hipertensão e outras circunstâncias capazes de potencializar o desenvolvimento da Síndrome Metabólica na fase adulta.

2.3 TRATAMENTO CONVENCIONAL DAS DEFICIÊNCIAS NUTRICIONAIS E NOVAS ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS

O tratamento do quadro de deficiência nutricional é realizado com base no quadro clínico do paciente, apresentando duas vertentes: o peso e idade, vale ressaltar que a primeira vertente observa características importantes para diagnóstico (BRASIL, 2014). Entretanto, na outra fase, são solicitados exames laboratoriais que podem ajudar no diagnóstico, apontando alterações metabólicas. Também são os exames laboratoriais que ajudam a determinar a falta de nutrientes essenciais para a regulação e funcionamento adequado do metabolismo (BUFF et al., 2005).

O tratamento da desnutrição tem como principal objetivo fornecer os nutrientes necessários para o bom funcionamento do metabolismo a fim de minimizar os impactos desencadeados pela deficiência de nutrientes (VASCONCELOS; TIRAPEGUI, 2002).

A comunidade científica tem buscado o uso de estratégias terapêuticas de suplementação nutricional nos últimos anos a fim de ampliar o bem-estar, reduzir os efeitos colaterais atrelados às alterações metabólicas e aumentar a eficácia do sistema imunológico (VASCONCELOS; TIRAPEGUI 2002). A grande diversidade da natureza motiva cada dia mais a pesquisa de compostos naturais e substâncias bioativas. Medicamentos convencionais apresentam, em sua grande maioria, apenas um único princípio ativo responsável pelo potencial farmacológico. Já as substâncias bioativas apresentam multicomponentes que atuam em alvos farmacológicos diferentes (FERREIRA, 2009).

O crescimento das pesquisas desenvolvidas com compostos bioativos se apresenta como alternativa para saúde, porém essas alternativas são praticamente inexistentes nos sistemas públicos e privados de saúde. Por esse motivo, tornou-se crescente o uso de substâncias bioativas pela população brasileira, e esse aumento

pode ser explicado a partir do desenvolvimento de novas terapias mais eficazes e menos agressivas destinadas à atenção primária à saúde (GUIZARDI et al., 2008).

2.4 A PRÓPOLIS VERDE

A própolis verde é produzida a partir da interação das abelhas da espécie *Apis mellifera* com apices vegetativos da *Baccharis draunculifolia* ou alecrim-do-campo, como é popularmente chamada. A própolis é sintetizada pela abelha africanizada (*Apis mellifera*) e utilizada por ela para selar a colmeia, esterilizar o ambiente interno e impedir o desenvolvimento de agentes microbianos e outros agentes nocivos prejudiciais à sobrevivência do grupo (MITSUNO; NEIDLEIN, 1997; BANSKOTA et al., 2000; BASNET; MIRANDA et al., 2019).

Figura 1 – (A) *Apis Mellifera* coletando resina na *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae); (B) Própolis verde bruta



Fonte: Grupo de Pesquisa APICRIM, 2022.

A própolis verde é um material duro e quebradiço quando armazenado em baixas temperaturas, porém quando mantido em temperatura ambiente é bem pegajosa e flexível. Sua coloração depende da origem botânica. A substância destaca-se por suas propriedades antimicrobianas, antivirais, anestésicas, imunoestimulantes, hepatoprotetora, cicatrizantes, antioxidantes e anti-inflamatórias (FERREIRA, 2021)

A maior parte das propriedades da própolis verde, em geral, são bem

conhecidas. Sua composição química pode chegar a 350 (trezentos e cinquenta) compostos que variam bastante, dependendo da região do mundo em que a própolis for coletada (CASTALDO et al., 2007).

Dentre os diversos compostos químicos presentes na própolis verde os flavonoides ganham um grande destaque, por exercer diversas atividades fisiológicas e metabólicas e desenvolver importante atividade hepatoprotetora (LUSTOSA et al., 2008). Os experimentos de Banskota e colaboradores (2000), mostram o potencial que o extrato aquoso da própolis verde tem em capturar dos radicais livres e promover atividade hepatoprotetora.

Nos últimos anos a comunidade científica passou a investigar o potencial da própolis verde em extratos alcoólicos e aquosos. Apesar do extrato aquoso da própolis consistir apenas na parte solúvel em água, ele contém os derivados do ácido cinâmico prenilado, como artepillin C, bacarina e drupanina; derivados do ácido cafeoilquínico, bem como alguns flavonoides (HERRERA et al., 2010).

Talvez por conter menos compostos em sua solução, o extrato aquoso da própolis ainda seja pouco estudado quando utilizada no tratamento em organismos nutricionalmente alterados. A presente proposta de pesquisa busca contribuir para a redução da lacuna nesse campo do conhecimento, bem como no desenvolvimento de uma complementação alternativa aos tratamentos farmacológicos tradicionais.

2.5 EMULSÕES E NANOESFERAS

As emulsões fazem parte do sistema das dispersões. Normalmente esse sistema é caracterizado por uma fase dispersa em meio a uma "fase contínua".

A fase dispersa geralmente está em forma de partículas ou gotículas que se encontram dispersas em um outro meio líquido: a "fase contínua". Um terceiro componente torna-se necessário para estabilizar o composto, visto que normalmente as fases não se misturam (TADROS et al., 2004).

Para fins de diferenciação, enquanto as emulsões são sistemas mais grosseiros, as microemulsões e nanoesferas são mais finas, dado o tamanho reduzido das gotículas ou partículas. A depender da literatura consultada, o tamanho das partículas de uma nanoesfera podem variar de 5nm a 200nm (ATTWOOD, 2016). Normalmente, o resultado é um produto de aspecto mais transparente e mais estável. Porém, o que garante a estabilidade das emulsões são os tensoativos ou surfactantes

adicionados ao composto para impedir a separação das fases (AULTON, 2016).

Uma das vantagens das nanoesferas, dentre outras, é o fato de que necessitam usar menor concentração de tensoativos para estabilizar o composto. Além disso, as nanoesferas de óleo em água (O/A) são termodinamicamente instáveis, porém estáveis do ponto de vista cinético, graças à ação dos tensoativos (ROCHA, 2017).

As nanoesferas também têm despertado o interesse dos pesquisadores em razão da sua capacidade de transportar fármacos capazes de penetrar profundamente em tecidos como o fígado e o intestino através dos capilares finos. Por isso, as nanoesferas trouxeram grande avanço no campo terapêutico (ECCLESTON, 2016).

As estratégias terapêuticas convencionais, tais como injeções e comprimidos, por vezes apresentam momentos de pico de concentração sanguínea e depois caem. O problema é que esses picos de concentração podem estar próximos do nível em que o fármaco se torna tóxico para o organismo. De igual modo, as quedas de concentração podem atingir níveis tão baixos a ponto de se tornarem ineficazes e não contribuir com o tratamento. Em razão disso, novas doses do ativo são necessárias, para reiniciar o ciclo (DURÁN; AZEVEDO, 2002).

As nanoesferas permitem que haja um controle na liberação do fármaco no organismo, mantendo sua concentração entre os limites máximo e mínimo tolerados. Também, permitem que uma única dose tenha um efeito terapêutico duradouro e, por isso, é uma estratégia mais econômica. Os efeitos adversos são consideravelmente menores, gerando melhor qualidade de vida ao paciente (BRUXEL et al., 2012).

Outra vantagem de se administrar fármacos por meio das nanoesferas é o aumento da biodisponibilidade das substâncias, pois elas podem alcançar a corrente sanguínea sem a necessidade de ser processado e modificado pelo fígado. Quando a administração do fármaco se dá pela via oral e a sua capacidade de dissolução não é boa, pode ocorrer a não absorção desse ativo pelo trato intestinal com a velocidade esperada, e isso reduzirá as concentrações desse mesmo fármaco na corrente sanguínea (APOLINÁRIO et al., 2020).

Dessa maneira, certamente um dos pontos de destaque do emprego das nanoesferas nas estratégias terapêuticas está na sua capacidade de veicular fármacos lipofílicos em um sistema aquoso. Essa capacidade combinada com o tamanho reduzido das partículas ou gotículas permite aumentar a superfície de contato com a pele e as membranas biológicas, influenciando diretamente sobre a absorção do fármaco (OLIVEIRA et al., 2018).

Esse tipo de nanoesfera também pode ser diluída em água, sem interferência na distribuição e no tamanho das gotículas. Enquanto isso, os fármacos permanecem protegidos da hidrólise e da oxidação em razão de estarem encapsulados em gotas de óleo. Esse encapsulamento pode, até mesmo, mascarar o sabor amargo de alguns fármacos, no caso da administração oral (SEIBERT et al, 2019).

3 OBJETIVOS

Nesta seção serão apresentados os objetivos gerais e específicos delineados para a pesquisa. A partir deles, será possível prover a resposta ao problema de pesquisa.

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar os efeitos da suplementação nutricional com nanoesferas de própolis verde no perfil metabólico em camundongos submetidos à dieta hipoproteica

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para atingir o objetivo geral, foram delineados os seguintes objetivos específicos:

1. Coletar e selecionar a própolis verde bruta;
2. Realizar a extração aquosa da própolis verde e determinar o teor de flavonoides presentes no extrato;
3. Desenvolver as nanoesferas de extrato aquoso da própolis verde e caracterizar a estabilidade e índice de polidispersão;
4. Avaliar o efeito das dietas normoproteica e hipoproteica no parâmetro peso corporal dos animais e
5. caracterizar o efeito da administração oral das nanoesferas de extrato aquoso da própolis verde nos parâmetros metabólicos, bioquímicos e histopatológicos nos grupos normoproteicos e hipoproteicos.

4 JUSTIFICATIVA

Diversos relatórios da Organização das Nações Unidas dão conta da seriedade dos problemas que envolvem a questão da segurança alimentar e da subnutrição crônica. Os mesmos relatórios também alertam para o aumento significativo nas deficiências alimentares, principalmente em mulheres (UNICEF, 2021). Apontam ainda que mais de 2 bilhões de pessoas sofrem com as deficiências de micronutrientes e apresentam quadro preocupante de subnutrição. Essa é uma questão que, não só justifica a realização deste trabalho do ponto de vista social, como também exige a participação da comunidade acadêmica para a produção de conhecimento e tecnologias que contribuam para a resolução do problema.

Nesse mesmo sentido, o desenvolvimento tecnológico é dependente do desenvolvimento acadêmico. Ambos precisam estar firmemente apoiados em métodos científicos para a construção do conhecimento necessário para o progresso. Embora haja crescente interesse da comunidade científica pelas propriedades e efeitos decorrentes do uso medicinal e popular da própolis verde, ainda se observam lacunas e necessidade de confirmação de resultados já obtidos no campo das pesquisas que investigam os efeitos da própolis verde no metabolismo, sobretudo os extratos aquosos. Tudo isso, somado à necessidade de aperfeiçoamento e aplicação da tecnologia de nanoesferas, para o uso da própolis verde, justificam a realização desta pesquisa em seu aspecto científico e tecnológico.

Os resultados provenientes dessa pesquisa contribuirão para o estabelecimento de uma nova estratégia nutracêutica com melhor aproveitamento das moléculas, sem comprometer as propriedades físico-químicas e/ou farmacológicas do extrato da própolis verde.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

Para o desenvolvimento do presente trabalho foram utilizados os seguintes materiais e reagentes:

5.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

- Etanol P.A (Quemis);
- Twen 80 U.S.P (Synth);
- Soro fisiológico (Sequiplax);
- Água destilada;
- Água milli-Q (Millipore®)
- Solução salina;
- Ketamina (Sespro indústria e comercio Ltda);
- Xilazina (Sespro indústria e comercio Ltda);
- Metanol Deuterado;
- Hidróxido de sódio;
- Fosfato de Sódio;
- Fosfato de Potássio;
- Álcool 70%; 80% e 90%;
- Álcool metílico;
- Acetona PA;
- Kit de coloração Panotipo rápido;
- Hematoxilina;
- Eosina;
- Polímero PCL 0,55%;
- Tensoativo Span 80, 0,14%;
- Tensoativo Tween 80, 0,21%;
- PARAFORMALDEÍDO 4% TAMPONADO – PH 7,2;
- Fosfato de Sódio Monobásico (1H₂O);
- Fosfato de Sódio Dibásico (7H₂O);
- Formol 37%;
- Xilol;
- Kit Bioclin para dosagem de Proteínas Totais;

- Kit Bioclin para dosagem de Aspartato Aminotransferase;
- Kit Bioclin para dosagem de Alanina Aminotransferase;
- Kit Bioclin para dosagem de Gama Glutamil Aminotransferase;
- Kit Bioclin para dosagem de Fosfatase Alcalina;
- Kit Bioclin para dosagem de Lipídeos Totais;
- Kit Bioclin para dosagem de Triglicérides;
- Kit Bioclin para dosagem de Lipoproteína de alta densidade;
- Kit Bioclin para dosagem de Glicose;

5.2 EQUIPAMENTOS

- Microscópio óptico;
- Tesouras cirúrgica inox;
- Pinça cirúrgica inox;
- Lâmina de bisturi aço carbono;
- Seringas de insulina Bd sem agulha (Plastic);
- Agulha hipodérmica 26g (BD Precision Glide);
- Agulha 18g, para aspiração e preparo dos anestésicos;
- Agulha de gavagem para camundongo;
- Algodão e compressas de gaze;
- Cassete histológico com tampa;
- Lâmina para microscopia 26x76 e lamínula de vidro 24x24;
- Luvas de procedimento látex;
- Papel toalha;
- Pipeta de Pasteur graduada 1ml;
- Micropipeta volume regulável 100-1000µL e 20-100µL;
- Ponteiras 0,1-1000µL;
- Ração Dieta Ain 93 – 3% de proteína;
- Centrifuga Herolab Microcen 16;
- Estufa de laboratório;
- Balança Shimadzu e Quimis;
- Vortex Motion II (Logen Scientific);
- Refrigerador -80°C (Thermo Fisher Scientific);

- Freezer -20°C Brastemp flex;
- Termômetro;
- Banho Maria;
- Navalha para Micrótomo;
- Vidros tipo penicilina de 8,5 ml;
- Seringas de insulina BD sem agulha (Plastic);
- Leitor de ELISA (Molecular Devices®);

6 METODOLOGIA

Este capítulo apresenta o método e os materiais utilizados para a coleta do material e a obtenção dos extratos.

6.1 COLETA DA PRÓPOLIS E OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

A própolis bruta foi extraída na Fazenda Camponesa, localizada no endereço Estrada Pratinha – Medeiros (LMG-827) KM 3 à esquerda – Zona Rural – Pratinha/MG. Ecologicamente a região e a frequência de visita das abelhas e da coleta de resina faz com que a composição química da própolis seja bem complexa e bem diferenciada (LUSTOSA et al., 2018). É de grande importância determinar a origem geográfica para comparar a sua grande variedade química, para que se possa ter um controle de qualidade efetivo e até mesmo uma padronização de amostra de própolis para aplicação em pesquisas com finalidades terapêuticas (Alencar et al., 2002).

Para a presente pesquisa foi utilizado apiários já implantados na Fazenda com o manejo e produção já bem estabelecidos e em plena produção, foram instalados coletores de própolis em colônias de abelhas *Apis mellífera* alojadas em colmeias.

O coletor de própolis inteligente possibilita uma abertura na colmeia nas partes laterais podendo coletar a própolis de forma rápida, padronizada e sem contaminantes físicos, utilizando, por exemplo, lascas de madeira (FIG. 2).

Figura 2 - Coletor de própolis inteligente (CPI)

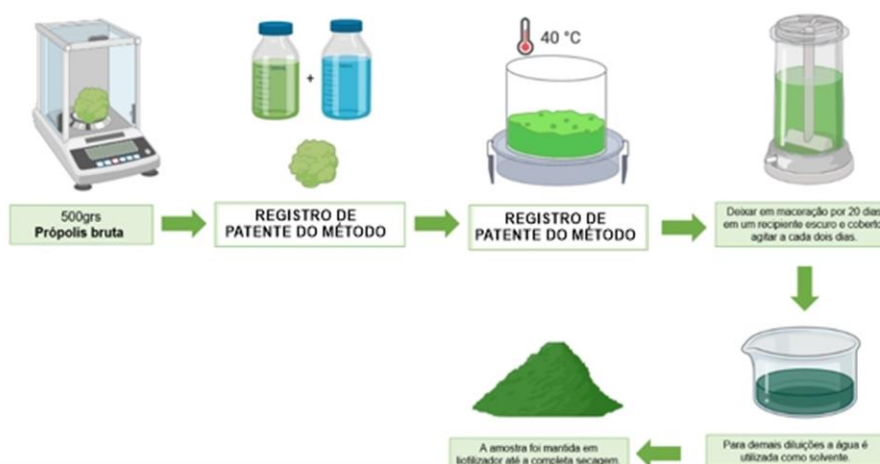


Fonte: Grupo de Pesquisa APICRIM, 2022.

6.1.1 Obtenção do extrato aquoso de própolis verde

O extrato aquoso de própolis verde foi obtido conforme se vê na Figura 3, empregando a metodologia proposta por Bastos et al. (2010). Por motivos de registro de patente, parte da metodologia ainda é restrita ao grupo de pesquisa.

Figura 3 - Metodologia dinâmica para obtenção do extrato aquoso de própolis verde.



Fonte: Autoria própria.

Parte da metodologia consistiu na solubilização do material em água ultrapura, aquecimento em alta temperatura e armazenamento por 20 dias em temperatura ambiente. Posteriormente outras diluições foram feitas utilizando a água como solvente e posteriormente submetido ao processo de secagem. Para as avaliações, o

extrato aquoso foi solubilizado em água ultrapura em quantidade suficiente para as doses de 500mg/kg sendo preparadas imediatamente antes do uso (Figura 3).

6.1.2 Avaliação da presença de flavonoides no extrato aquoso de própolis verde

Atualmente, a utilização extratos de própolis verde para manutenção da saúde tem se mostrado bastante promissora. Um dos parâmetros apontados pelo MAPA para controle e garantia da qualidade do extrato comercial de própolis é a concentração e teor de flavonoides. A análise possibilita avaliar a presença de diferentes classes de metabólitos secundários em extratos de compostos naturais. O extrato aquoso de própolis verde foi avaliado por meio do método espectrofotométrico para determinação da concentração de flavonoides, conforme descrito por Woisky (1998).

A quantificação do teor de flavonoides presentes no extrato aquoso de própolis é de grande importância, visto que várias propriedades biológicas da própolis verde são atribuídas aos metabólitos presentes na própolis (SAWARA, 2011).

A determinação do teor de flavonoides foi realizada através da leitura em espectrofotômetro, a 450 nm, no leitor de Eliza. Para realizar a análise foi utilizado a metodologia adaptada de Bronole e colaboradores (2014). Foi necessário preparar uma solução da amostra a ser testada (2,5 mg/ml) em etanol, seguido do preparo de uma solução de Cloreto de Alumínio a 10%, pesando 0,3g de Cloreto de Alumínio sendo necessário solubilizar em água ultrapura com volume final de 10mL.

Em uma placa de poliestireno transparente de fundo plano, de 96 poços, foram adicionados 40ul de etanol P.A. Em seguida, foram adicionados 100ul da solução estoque da amostra em triplicata nos respectivos poços. Para preparo do branco, foram adicionados 100ul da solução estoque da amostra, 44ul de etanol P. A., 4ul de Acetato de Potássio e 52ul de da amostra nos poços. Preparou-se 10ml do padrão de quercetina na concentração de 0,2mg/ml, pesando 0,002g de quercetina em 10ml de água ultrapura.

Adicionou-se o padrão na placa, para obter 10 concentrações diferentes para determinar a curva de calibração do padrão da amostra. Em seguida, adicionou-se 4ul da solução de Cloreto de Alumínio nas amostras e nos padrões. Também foram

adicionados 52ul de água ultrapura nas amostras e nos padrões, deixando encubar por 45 minutos ao abrigo de luz. Em seguida, realizou-se a leitura da amostra, branco e padrão, a 450 nm, no leitor de Eliza (Molecular Devices) que está disponível no laboratório multiusuário da escola de farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto.

6.1.3 Obtenção das nanoesferas de extrato de própolis verde e caracterização das nanoesferas

As nanoesferas contendo o extrato aquoso de própolis foram preparadas utilizando a metodologia adaptada de Fessi *et al.* (1989).

O método consiste na formação de nanoesferas a partir da mistura da fase orgânica com a fase aquosa. A fase orgânica, contendo o polímero PCL 0,55% p/v, o tensoativo Span 80 0,14% p/v e a acetona como solvente foram agitadas por 15 minutos com leve aquecimento. Em seguida foi adicionado 1mL de solução de extrato aquoso da própolis verde, agitando por 10 minutos. A solução aquosa foi composta por água MilliQ e o tensoativo Tween 80 0,21% p/v mantida por agitação e leve aquecimento no agitador magnético. A fase orgânica foi vertida em forma de gotejamento sob a fase aquosa. Em seguida, utilizou-se o rota-vapor para evaporação do solvente.

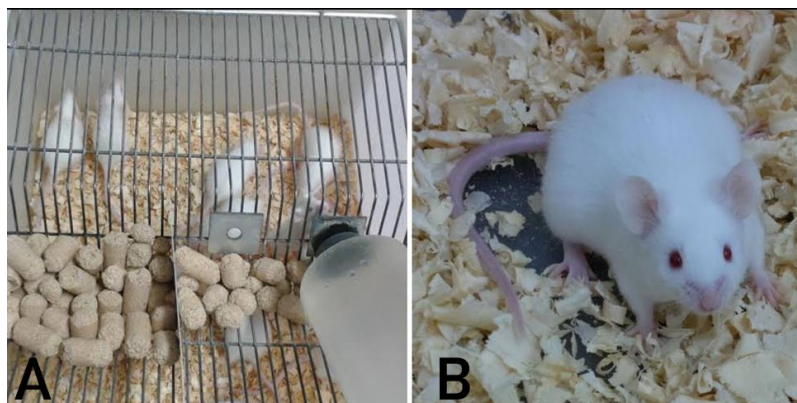
Após a obtenção das nanoesferas, foi realizada a caracterização das partículas, a fim de determinar o tamanho, índice de polidispersão e potencial Zeta. Sendo assim, para a avaliação dos parâmetros, uma alíquota de 1mL da nanoesfera de extrato aquoso de própolis verde foi inserida em cubeta e a leitura foi realizada automaticamente pelo Zetasizer, o qual exibe o resultado em tempo real.

Todo o desenvolvimento das nanoesferas e as caracterizações foram realizadas com a participação e colaboração de pesquisadores do Laboratório de Desenvolvimento Galênico e Nanotecnologia na Escola de Farmácia, localizado na Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP).

6.2 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos da linhagem Swiss (35 ± 5g) provenientes do Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto.

Figura 4 - (A) Caixa contendo maravalha; (B) Camundongos da Linhagem Swiss fêmeas



Fonte: Autoria própria

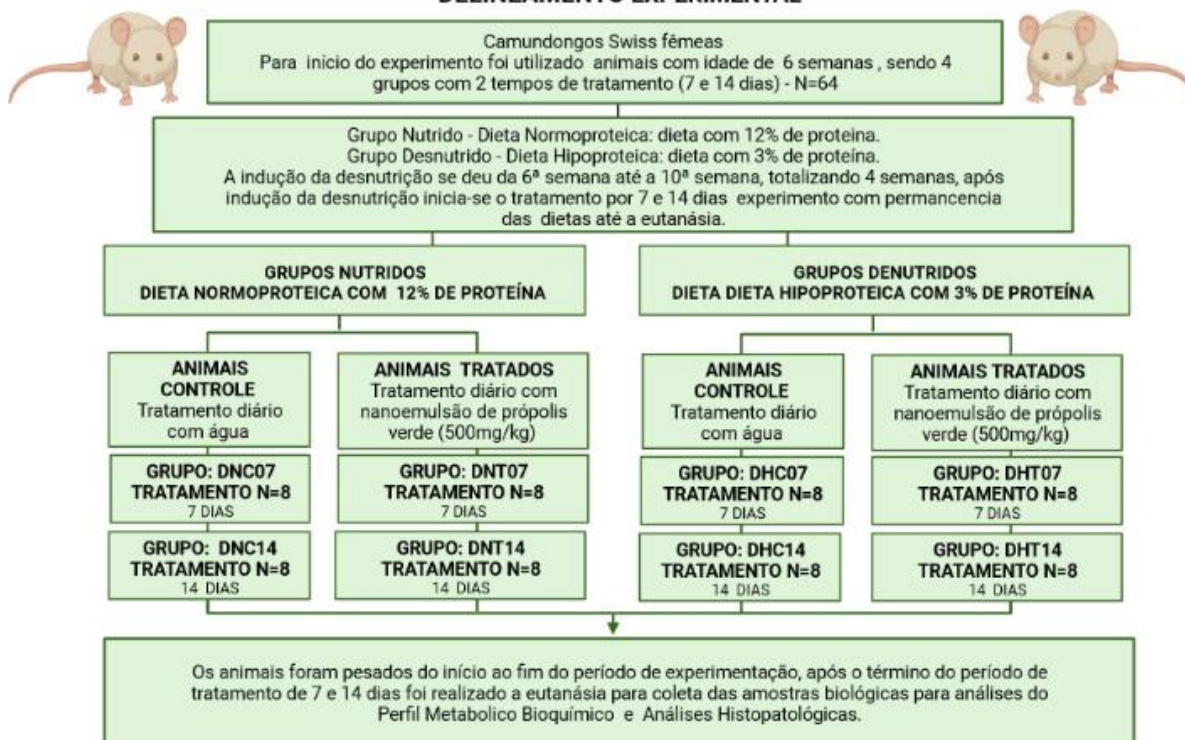
Os animais foram gerados e mantidos no (CCA), com 25 (vinte e cinco) trocas/hora de ar, com acesso livre à ração e água em temperatura média de 24°C até a realização dos procedimentos experimentais. Os animais foram mantidos em caixas com 4 (quatro) animais em cada, contendo maravalha. (Figura 4). As caixas eram higienizadas a cada 03 (três) dias. Para excluir a influência de alimentos na absorção das nanoesferas de extrato aquoso de própolis administrada por via oral, o alimento dos animais foi retirado 1 hora antes da administração do tratamento diário, via gavagem. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com a Lei Arouca (Lei nº 11.794/2008) e com aprovação prévia da Comissão de Ética em Uso Animal da Universidade Federal de Ouro Preto, sob protocolo de nº 3496020821.

6.3 MODELO EXPERIMENTAL

A pesquisa seguirá o delineamento representado abaixo:

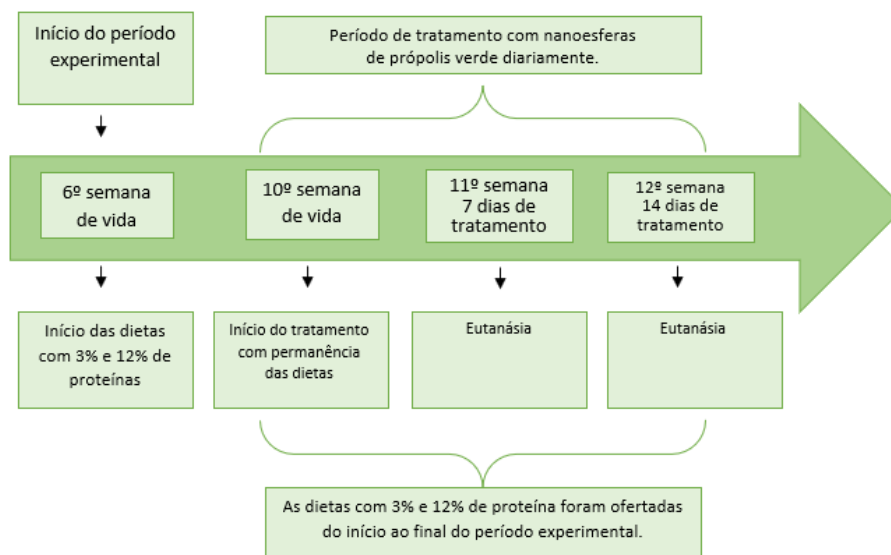
Figura 5 - Delineamento experimental

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL



Fonte: autoria própria.

Figura 6 - Linha do tempo do período experimental com os principais procedimentos.



Fonte: autoria própria.

Para a avaliação dos efeitos das nanoesferas de extrato aquoso da própolis verde na modulação do metabolismo, foram utilizados 64 (sessenta e quatro) camundongos da linhagem Swiss fêmeas, pesando entre 20g na 6ª semana de vida e chegando a 47g, em média, na 12ª semana. Os animais foram divididos em 8 (oito) grupos (Quadro 1), os procedimentos experimentais foram iniciados a partir da 6ª semana de vida com a introdução das dietas Normoproteica (12% de proteína) e Hipoproteica (3% de proteína). O início das dietas a partir da 6ª semana de vida é um protocolo já padronizado (Barcelos et al., 2018), utilizado pelo grupo de pesquisas visando avaliar o aumento ou diminuição após o desmame dos animais.

Quadro 1 - Distribuição dos grupos experimentais

Grupo DNC07	Grupo DNC14
- Dieta normoproteica contendo 12% de proteína; - Tratamento controle diário com água; - Tempo de 7 dias.	- Dieta normoproteica contendo 12% de proteína; - Tratamento controle diário com água; - Tempo de 14 dias.
Grupo DNT07	Grupo DNT14
- Dieta normoproteica contendo 12% de proteína; - Tratamento diário com nanoesferas de própolis verde com concentração de 500mg/kg; - Tempo de 7 dias.	- Dieta normoproteica contendo 12% de proteína; - Tratamento diário com nanoesferas de própolis verde com concentração de 500mg/kg; - Tempo de 14 dias.
Grupo DHC07	Grupo DHC14
- Dieta hipoproteica contendo 3% de proteína; - Tratamento controle diário com água; - Tempo de 7 dias.	- Dieta hipoproteica contendo 3% de proteína; - Tratamento controle diário com água; - Tempo de 14 dias.
Grupo DHT07	Grupo DHT14
- Dieta hipoproteica contendo 3% de proteína; - Tratamento diário com nanoesferas de própolis verde com concentração de 500mg/kg; - Tempo de 7 dias.	- Dieta hipoproteica contendo 3% de proteína; - Tratamento diário com nanoesferas de própolis verde com concentração de 500mg/kg; - Tempo de 14 dias.

Fonte: autoria própria.

6.4 ALIMENTAÇÃO E DIETA COM RESTRIÇÃO DE PROTEÍNA

De acordo com a Quadro 1, os animais do grupo normoproteico receberam a dieta contendo 12% de proteína, conforme recomendado para roedores. Por sua vez, os animais do grupo hipoproteico receberam a dieta contendo 3% de proteína *ad libitum*. Além disso, não houve restrição alimentar, mas apenas restrição na porcentagem de proteína ofertada na alimentação *ad libitum* dos camundongos. A dieta hipoproteica, contendo 3% de proteína (caseína) em sua constituição, teve como referência a dieta AIN-93M, recomendada para roedores (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993). A composição das dietas constituiu-se de ingredientes específicos

para roedores, a ração é comercializada pela Prag Soluções Biociências®. Por se tratar de uma dieta manipulada, a ração utilizada conta com uma combinação de ingredientes balanceada com a quantidade de calorias totais com quantidade padronizada de amido de milho, caseína, sacarose, óleo de soja, mix de minerais, mix de vitaminas, L cistina e Bitartarato de colina. (ANEXO D - Ingredientes receita AIN-93 para roedores comercializada pela PragSoluções).

6.5 TRATAMENTO

Para o tratamento, o extrato foi ressuspenso em água MiliQ, obtendo-se porções com concentrações de 500mg/kg a cada dia, a concentração foi definida de acordo com a capacidade de interação do solvente com a substância bruta, permitindo um encapsulamento eficiente sem a precipitação do solvente, mantendo as concentrações e interações na caracterização dos sistemas de Polidispersão.

As porções foram homogeneizadas em vórtex e a administração foi realizada via oral, por gavagem, na qual foi administrada diariamente 500µl por animal. Para o grupo controle, foi administrado o mesmo volume de água MiliQ.

Assim sendo, a gavagem orogástrica das nanoesferas à base de extrato aquoso de própolis verde foi realizada a partir do 1º dia de tratamento experimental até o 7º e 14º dia. Além disso, contou-se com tempos de tratamentos diferentes, sendo eles grupos com 7 dias de tratamento e grupos com 14 dias de tratamento. Para a realização dos tratamentos por meio da gavagem orogástrica foi realizada a contenção dos camundongos e o tratamento das nanoesferas à base de extrato aquoso de própolis verde. O tratamento adequado foi injetado de forma oral por meio de uma sonda de gavagem com tamanho adequado para camundongos acoplada a uma seringa plástica (Figura 6).

6.6 AVALIAÇÃO DO PESO CORPORAL

A análise de ganho ou perda de peso tem a finalidade de avaliar o estado nutricional e verificar as funcionalidades das dietas hipoproteica e normoproteica. Os animais tiveram seus pesos coletados e planilhados. A coleta dos pesos foi realizada semanalmente, com intervalo de 7 dias, durante todo o período experimental e no dia da eutanásia. Assim, através do resultado do peso final subtraído do peso inicial, foi

possível obter o ganho ou a perda de massa corpórea durante o período de experimento.

6.7 EUTANASIA

No dia da eutanásia, os animais foram anestesiados com doses de Xilazina 10mg/kg e Cetamina 100mg/kg via intraperitoneal. Após a anestesia e avaliação dos reflexos e comprovação da ausência de sinais vitais, os camundongos foram colocados em uma superfície plana, e em seguida, submetidos ao procedimento de exsanguinação por punção cardíaca e, em seguida, fez-se a retirada do fígado. Após o término da coleta do material biológico, as carcaças dos animais foram dispensadas em saco plástico fechado, lacrados e posteriormente armazenados em freezer situado no Centro de Ciência Animal (CCA-UFOP), para posterior recolhimento e descarte por empresa especializada.

6.8 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

6.8.1 Análises bioquímicas

O sangue dos animais foi obtido por exsanguinação, por punção cardíaca, com os animais anestesiados e em jejum por 12 horas. Após a coleta do material biológico, o tubo foi homogeneizado lentamente por inversão. As amostras coletadas foram dispostas em microtubos previamente identificados e acondicionados em caixa térmica para conservação até o término da eutanásia de todos os animais do grupo para as análises, garantindo maior estabilidade do material biológico. Para estabelecer o perfil bioquímico dos animais foram utilizadas amostras de 1000 µL de sangue coletadas através da exsanguinação, por punção cardíaca, em microtubos com ativador de coágulo. Posteriormente foram submetidas à centrifugação para separação do soro. Após retração do coágulo (cerca de 30 minutos após coleta), estes foram centrifugados a 3500 rpm, em temperatura ambiente, durante 10 minutos, para a obtenção do soro utilizado nas análises bioquímicas. Todos os ensaios bioquímicos foram realizados na Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto no Laboratório Multiusuário, Bloco 3, sala 32.

Para determinação da concentração de proteínas totais utilizou-se o método de

Biureto (ZAIA; ZAIA; LICHTIG, 1998). O método é baseado nas reações do biureto que é constituído de uma mistura de cobre e hidróxido de sódio com um estabilizante do cobre em solução. Para tal, em duplicata, pipetou-se 50µL do soro para uma placa de poliestireno transparente de fundo plano de 96 poços. Em seguida, adicionou-se 200µL do reagente de trabalho, 200 µL do reagente biureto. Na sequência, a placa de poliestireno foi mantida em descanso por 10 minutos incubadas à 37°C. Após esse tempo, a leitura foi realizada no leitor de microplacas de Elisa a 700nm.

A função hepática foi avaliada pela quantificação das concentrações de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), Gama glutamil transferase (GGT) e Amilase, o método utilizado para as dosagens das enzimas é baseado no método cinético Szasz Modificado/Padronizado pela IFCC utilizando os kits comerciais enzimáticos da marca Bioclin ®.

A determinação de AST, AST, GGT e Amilase se dá através de métodos cinéticos. Sendo assim, foram pipetados e misturados 50µL do soro dos animais, adicionando-se 1,0 mL do reagente de trabalho. Foram transferidos 200µL da amostra para a placa de poliestireno transparente de fundo plano de 96 poços previamente incubadas à 37°C. Esperou-se 1 minuto para realizar a leitura inicial em leitora de microplacas de Elisa. Para cada enzima utilizou-se kits comerciais específicos, após a leitura foi calculada a média das diferenças de absorbância por minuto.

Para determinação do perfil lipídico avaliou a qualidade de Lipídios Totais e HDL, utilizando o método enzimático Trinder. Foram utilizados 10µL de amostra dos animais, 50µL da solução padrão e 50µL do branco em seguida a placa foi incubada a 37°C por 5 minutos. Após esse período foi realizada a leitura em microplaca de 96 poços. Para avaliação dos níveis de triglicérides foi empregado o mesmo método em menor quantidade de amostra, portanto utilizaram-se 10µL de amostra 500µL do reagente branco e 500µL do reagente padrão. Em seguida foram transferidos 20µL para a placa de poliestireno transparente de fundo plano de 96 poços previamente incubadas à 37°C, pelo período de 10 minutos, após o que foi realizada a leitura.

A dosagem de glicose se deu através do método de reação Enzimática Colorimétrica. Para a determinação foram adicionados 10µL de amostra a 500µL de reagente branco e 500µL do reagente padrão, em placa de poliestireno transparente de fundo plano de 96 poços, previamente incubadas a 37°C. A leitura foi realizada após incubação de 10 minutos.

Para dosagem da Albumina utilizou-se a metodologia verde de Bromocresol.

Foram adicionados 10 μ L de amostra a 1000mL de reagente branco e 1000mL do reagente padrão. Foram utilizados 200 μ L em placa de poliestireno transparente de fundo plano de 96 poços, previamente incubadas a 37°C. Em seguida, a leitura foi realizada após incubação de 10 minutos.

Os valores obtidos foram quantificados por meio dos kits comerciais enzimáticos da marca Bioclin®, utilizando o Leitor de Microplacas Elisa, e os resultados estão expressos em mg/dl, UI/L e U/L de acordo com os padrões de controle e qualidade que garantem valores de referência mais assertivos para animais de experimentação.

6.8.2 Análise histopatológica do fígado

Para cada animal em questão, foram confeccionadas lâminas histológicas a partir dos fígados. Após a eutanásia, os órgãos foram coletados e lavados com solução salina 0,9%. Em seguida, foram colocados em cassetes com identificação e emergidos em solução formalina 10% para fixação. Na sequência, esses órgãos passaram por um processamento manual, no qual ficaram imersos em soluções crescentes de álcool etílico (70%, 80%, 90%, 100%), sendo 30 minutos em cada álcool.

Posteriormente, os órgãos foram imersos em xilol a fim de tornar o tecido translúcido, logo incluídos em bloco de parafina. Os blocos de parafina, contendo os tecidos impregnados, foram submetidos à microtomia para obtenção dos cortes histológicos com espessura de 4 μ m. Os cortes foram colocados sobre as lâminas de vidros e mantidos em estufa a 60°C para secagem. Com os tecidos já aderidos à lâmina, eles foram desparafinizados em xilol e hidratados com concentrações decrescentes de álcool etílico (100%, 90%, 80% e 70%).

Os cortes foram lavados com água corrente e, após secagem, foram corados por hematoxilina e eosina (HE). Para isso, as lâminas foram imersas no corante hematoxilina (corante ácido) por 10 minutos e, em seguida, lavadas em água corrente e passadas rapidamente em álcool acidulado. Após nova lavagem em água corrente, as lâminas foram imersas no corante eosina (corante básico) por 30 segundos, e lavadas em água. Para finalizar o processo, as lâminas já secas foram imersas em xilol e montadas com historesina e lamínula.

6.8.3 Leitor panoramic scanner

As lâminas foram escaneadas pelo equipamento MoticEasyScan Infinity 3D, apropriado para digitalização de imagens em grande escala com alta resolução. As lâminas foram depositadas sob bandeja com 12 posições, e acomodadas no scanner. A captura das imagens se deu através do Software 3D Histech, todas as imagens são fornecidas como arquivo.mrx e só podem ser visualizadas no software Panoramic Viewer.

6.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados foram submetidos a testes estatísticos para confirmação das possíveis diferenças entre grupos em suas respectivas análises. Inicialmente foi realizado o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. Para comparação simples entre as duas colunas foi utilizado o Teste T Student. Para múltiplas comparações utilizou-se o teste Two way ANOVA com pós-teste de Tukey. Todas as análises e gráficos foram realizados utilizando o software GraphPad Prism 8.0, assumindo-se diferenças significativas de $p < 0,05$.

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 PROCESSO DE SELEÇÃO E ANÁLISE DA PRÓPOLIS VERDE BRUTA

A própolis verde é produzida pelas abelhas por meio da coleta de resinas vegetais e exsudados dos ápices foliares da *Baccharis dracunculifolia* e são transportados para o interior da colmeia pelas abelhas *Apis mellifera* (TEIXEIRA et al., 2005). A própolis é usada pelas abelhas como proteção contra insetos e microrganismos, para recobrir as paredes da colmeia, reforçar os favos, preencher as fissuras, restringir a entrada de estranhos na colmeia e, para embalsamar animais, atuando como um desinfetante e no preparo de locais assépticos para a postura da abelha rainha. Funciona como um antibiótico natural e evita infecções e epidemias entre as abelhas (LIMA et al., 2012; SARTORI, et al., 2012).

A composição química da própolis é muito complexa, sendo constituída, basicamente, por resinas (50%), ceras (30%), óleos vegetais (10%), pólen (5%) e componentes orgânicos (5%) (GOMEZ et al., 2006). Destacando-se entre eles, os flavonoides, grupo de substâncias ao qual são atribuídas propriedades antibióticas. Apresenta propriedades medicinais como anestésico, analgésico, cicatrizante, anti-inflamatório, antibacteriano, antifúngico, antiviral, antigripal, bioestimulante, dentre outras (FALCÃO et al., 2019).

A própolis coletada (Figura 7), apresentou características organolépticas com a cor verde, com um aroma “*sui generis*” muito presente e marcante, apresentando também uma maleabilidade compatível com estudos similares aos de Souza (2019). A própolis brasileira é uma das melhores em qualidade, se comparada aos demais países produtores, representando uma importante fonte de renda para o apicultor (BREYER, 1996). A escolha da própolis verde como substância para este estudo vai de encontro as indicações da organização mundial de saúde (OMS), que orienta o uso e a escolha de substâncias naturais como estratégia para o tratamento de inúmeras doenças. Além disso, ao realizarmos pesquisas com a própolis, estamos incentivando a cadeia produtiva apícola, valorizando os nossos recursos biofarmacológicos.

Figura 7 - Própolis verde no coletor de própolis inteligente



Fonte: Grupo de pesquisa APICRIM

7.2 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FLAVONOIDES NO EXTRATO AQUOSO DE PRÓPOLIS VERDE

A própolis verde acumula uma grande variedade de substâncias químicas que estão envolvidas em diversos processos fisiológicos, a determinação do teor de flavonoides tem a finalidade de determinar o padrão da qualidade da própolis e os solventes utilizados (FISCHER et al., 2010).

A caracterização da própolis verde é realizada através da determinação de parâmetros físicos e presença de alguns flavonoides, de acordo com os resultados apresentados na Tabela 2 (p. 49).

Os flavonoides atuam inibindo efeitos causados pelos radicais livres (MORAIS et al., 2009). Para obtenção do resultado a metodologia analítica apresentou linearidade de resposta, o coeficiente de correlação da reta foi obtido por meio de regressão linear utilizando valores obtidos na absorbância da amostra.

A partir da elaboração da curva de calibração para flavonoides encontra-se a real concentração de flavonoides na amostra analisada em triplicada. O teor de flavonoides encontrado na (Tabela 1) indica a presença de teores exigidos pelo Ministério da Agricultura (BRASIL, 2001).

Tabela 1 - Concentração de flavonoides no solvente aquoso usado na extração

Amostra	Absorbância	Concentração de Flavonoides
P1	0,023	0,2978 g/L

Fonte: Dados da pesquisa

É possível afirmar que o extrato obtido atende ao requisito mínimo do teor de flavonoides. Atualmente existe um grande número de estudos e pesquisas das substâncias com propriedades antioxidantes, em razão das possíveis interações com os radicais livres no organismo (KUMAZAWA et al., 2007; AHN et al., 2007; KALOGEROPOULOS et al.; 2009). Os estudos de Manrique e Santana (2008), por exemplo, indicam que teores baixos de flavonoides também apresentam uma atividade antioxidante promissora em extratos de própolis.

7.3 CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS PRESENTES NAS NANOESFERAS DE PRÓPOLIS VERDE

As emulsões fazem parte do sistema das dispersões, normalmente esse sistema é caracterizado por uma fase dispersa em meio a uma “fase contínua”. A caracterização das partículas tem a finalidade de determinar o tamanho, o índice de polidispersão e o potencial Zeta. O potencial Zeta (ζ) é uma medida da força de repulsão existente da atração das cargas existentes entre as micropartículas em um sistema emulsionado, sendo um dos parâmetros fundamentais para medir a estabilidade. (SCHAFFAZICK, 2003).

Os resultados da caracterização das nanoesferas de própolis verde estão descritos na Tabela 2. Os valores do potencial zeta (ζ) indicam que as nanoesferas de própolis verde apresentaram boa estabilidade e um perfil de distribuição homogêneo.

Tabela 2 - Caracterização das nanoesferas de própolis verde.

Amostra	ζ (mV)	IP	Z-ave (nm)
1	-29.1 ± 0.115	0.095 ± 0.019	176.2 ± 1.050
2	-30.3 ± 0.839	0.104 ± 0.0016	174.7 ± 0.4041

Z: Potencial Zeta, IP; Índice de Polidispersão; Z-ave(nm) Intensidade e tamanho das nanopartículas.

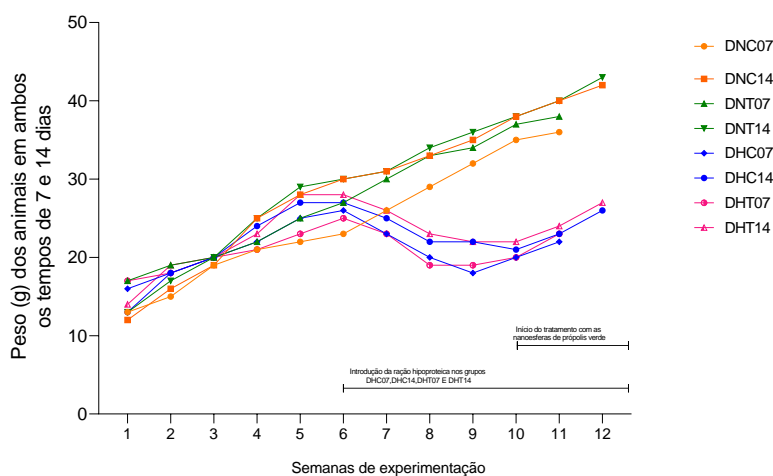
Fonte: Dados da pesquisa

De acordo com Saleh e colaboradores (2015), a eficiência de encapsulação de uma formulação é um parâmetro crucial para avaliar a retenção do princípio ativo e a capacidade de liberação. Os valores do Índice de Polidispersão (IP) devem permanecer entre 0 e 0,300 para indicar uma estabilidade e distribuição homogênea.

7.4 ANÁLISE DA FUNCIONALIDADE DAS DIETAS NORMOPROTEICA E HIPOPROTEICA

A análise de ganho ou perda de peso tem a finalidade de avaliar o estado nutricional e verificar a funcionalidade das dietas hipoproteica (DHC e DHT) e normoproteica (DNC e DNT). Nossos resultados demonstram que houve significativa perda de peso nos animais dos grupos que receberam a dieta hipoproteica, quando comparados aos grupos que receberam a dieta normoproteica. Essa diferença confirma que o nosso modelo experimental foi eficaz em estabelecer o estado de desnutrição hipoproteica (Gráfico 1).

Figura 1 – Peso dos animais obtidos ao longo das semanas de indução das dietas



Fonte: Dados da pesquisa

A análise do efeito do tratamento com as nanopartículas para os tempos de 7 e 14 dias (grupos DNT e DHT) indica um aumento de peso significativo nesses animais após o tratamento com as nanopartículas de própolis verde, quando comparados aos seus respectivos grupos controle não tratado (Figura 1).

Nossos resultados encontram similaridades com os resultados de Miranda e

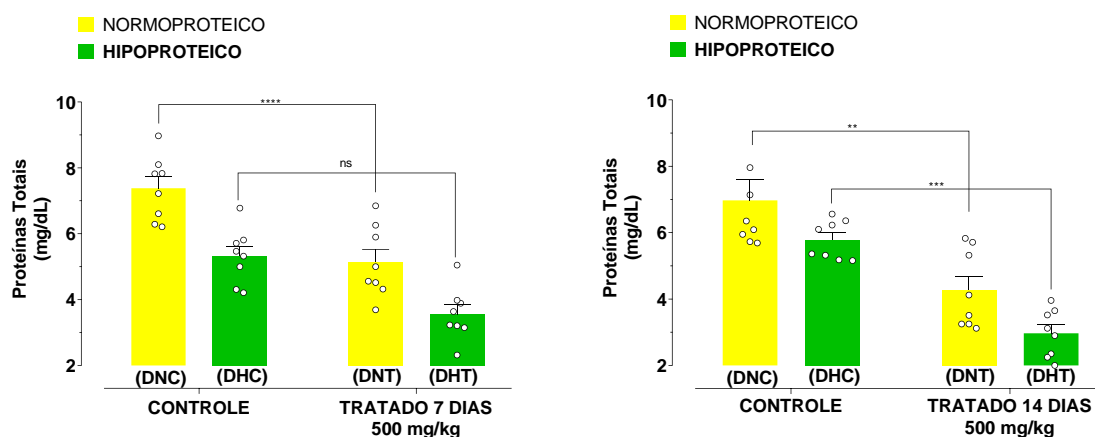
colaboradores (2018), demonstrando que os camundongos dos grupos que receberam a dieta hipoproteica, contendo 3% de proteína, apresentaram queda de peso antes de receber o tratamento. Após a administração do tratamento observou-se um aumento significativo no peso. Já os camundongos tratados com a dieta normoproteica, contendo 12% de proteína, apresentaram ganho de peso ao longo de todo o período experimental. Em um recente estudo elaborado com a finalidade específica de avaliar os efeitos da própolis verde brasileira sobre o peso de camundongos submetidos a dieta rica em carboidratos, Sakay e colaboradores (2017) concluíram que as substâncias presentes no extrato de própolis são capazes de suprimir o ganho de peso. Nesse experimento, Sakay e colaboradores (2017) verificaram que a própolis verde atua inibindo a absorção de gordura pelo organismo.

Em relação ao ganho posterior de peso, isso pode indicar a recuperação dos organismos em relação ao tecido muscular, antes insultado pela falta de proteína. Há de se considerar que o peso total envolve o peso de todos os componentes presentes no corpo. Desse modo, nossos resultados se assemelham aos de Miranda (2018) e aos de Gheisari, Shahrvand e Landy (2017), em que se observou o ganho posterior de peso pelos modelos antes submetidos à dieta hipoproteica.

7.5 PROTEÍNAS PRESENTES NA CIRCULAÇÃO SANGUÍNEA

As proteínas presentes na circulação sanguínea foram avaliadas através de ensaios bioquímicos que correlacionam informações dos lipídeos e eletrólitos, fornecendo informações válidas para avaliação da desnutrição. A quantidade de proteínas totais (Figura 8) indica redução nos níveis proteicos em todos os grupos (DNT e DHT) em relação ao grupo que recebeu a dieta normoproteica (DNC). Os grupos normoproteicos (DNT) e hipoproteicos (DHT) tratados exibiram significativa redução dos níveis proteicos em ambos os tempos (7 e 14 dias) quando comparados aos seus grupos controle. Não houve diferença significativa nos grupos (DHC) e (DHT) no tempo de 7 dias, já nos grupos (DHC) e (DHT) tratados pelo período de 14 dias pôde-se observar diferença estatisticamente significativa.

Figura 8 - Dosagem de proteínas totais nos níveis séricos em animais dos grupos controle e tratado com 500/mg/kg/dia de nanoesferas de própolis verde. O nível circulante da enzima nos animais dos grupos tratado foi reduzido apresentando diferenças significativas apenas nos grupos normoproteicos tratados por 7, grupos normoproteicos tratados por 14 dias e nos grupos hipoproteicos tratados por 14 dias. Em relação aos grupos controle as comparações foram observadas entre os grupos DNC vs. DNT e DHC vs. DHT. Para os resultados foi realizado o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. Para comparação simples entre as duas colunas foi utilizado o Teste T Student. Para múltiplas comparações utilizou-se o teste Two way ANOVA com pós-teste de Tukey. Todas as análises e gráficos foram realizados utilizando o software GraphPad Prism 8.0, assumindo-se diferenças significativas de $p < 0,05$.



A avaliação da dosagem dos níveis séricos de proteínas é uma metodologia importante e fundamental que favorece informações e diagnósticos importantes em alterações relacionados a desnutrição proteica em humanos ou em animais de experimentação (ZAIA; ZAIA; LICHITIG, 2008). Os animais dos grupos hipoproteicos tratados no período de 7 dias não apresentaram diferença significativa, já os animais dos grupos tratados pelo período de 14 dias apresentaram diferenças significativas nos níveis séricos de proteínas totais indicando uma melhora nos níveis basais de proteínas totais dos animais tratados com a nanoesfera de própolis verde, assemelhando-se aos resultados encontrados por Neiva e Melo (2000), os quais submetem animais a desnutrição hipoproteica durante o período de 8 semanas. Nossos resultados reforçaram a hipótese de que a própolis verde é capaz de influenciar no perfil proteico dos animais, fortalecendo a suposição de alteração na eletroforese de proteínas.

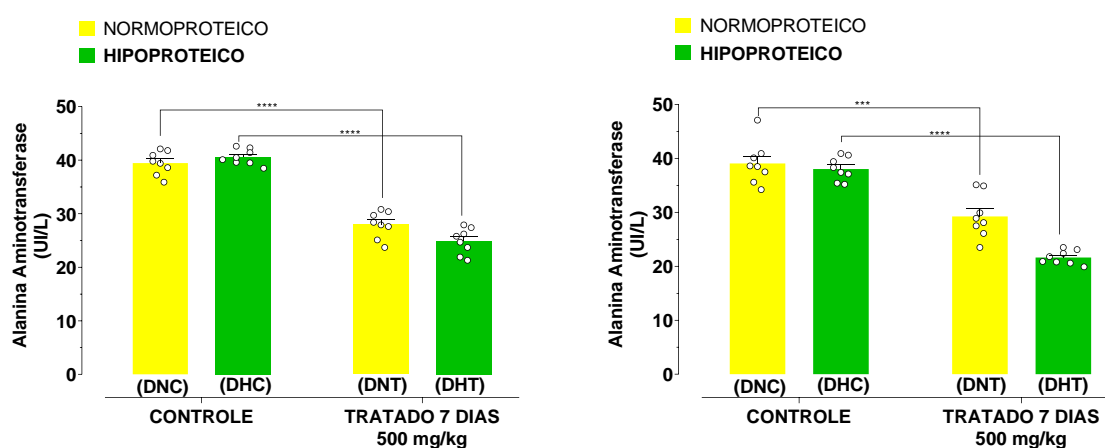
De acordo com achados de Ferraz et al., (2011), as macromoléculas presentes nos tecidos e órgãos tem a finalidade de catabolizar reações enzimáticas em alterações bioquímicas, que participam ativamente da defesa do organismo. Sendo assim, a avaliação dos níveis séricos de proteínas totais é um importante marcador para avaliação geral de alterações metabólicas de um indivíduo.

7.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA FUNÇÃO HEPÁTICA

7.6.1 Alanina aminotransferase (ALT)

A dosagem de alanina aminotransferase (ALT) é conhecida como enzima que participa das reações bioquímicas no fígado. É um marcador de lesões nos hepatócitos. Essa enzima é avaliada com a finalidade de investigar disfunções hepáticas. Observou-se que o tratamento com nanoesferas de própolis reduziu a atividade enzimática de ALT, indicando uma diminuição significativa nos grupos tratados normoproteico (DNT) e hipoproteico (DHT), nos tempos de 7 e 14 dias, quando comparados aos grupos controle sem tratamento para os mesmos tempos (Figura 9).

Figura 9 – Dosagem sérica de Alanina Aminotransferase (ALT) em animais dos grupos controle e tratado com 500/mg/kg/dia de nanoesferas de própolis verde. O nível circulante da enzima nos animais dos grupos tratado foi reduzido apresentando diferenças significativas entre eles nos tempos de 7 e 14 dias em relação aos grupos controle as comparações foram observadas entre os DNC vs. DHC e DNT vs. DHT. Para os resultados foi realizado o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. Para comparação simples entre as duas colunas foi utilizado o Teste T Student. Para múltiplas comparações utilizou-se o teste Two way ANOVA com pós-teste de Tukey. Todas as análises e gráficos foram realizados utilizando o software GraphPad Prism 8.0, assumindo-se diferenças significativas de $p < 0,05$.

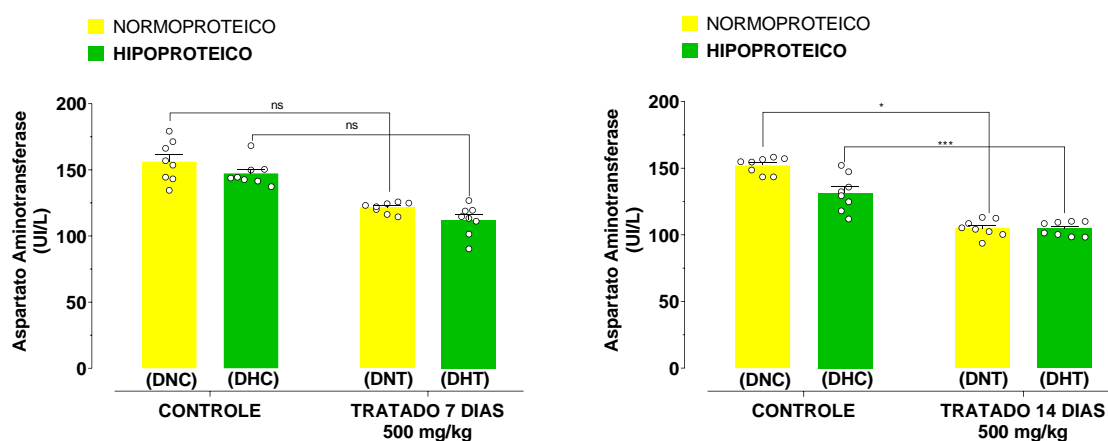


7.6.2 Aspartato aminotransferase (AST)

O aspartato aminotransferase (AST) é a enzima que possui a principal função de catalisar o aspartato em glutamato favorecendo recombinações enzimáticas. Após a dosagem, observou-se que o tratamento com nanoesferas de própolis nos grupos

(DNT e DHT tratados por 14 dias) reduziu a atividade enzimática de AST em ambos os tempos avaliados (Figura 10).

Figura 10 - Dosagem de Aspartato Aminotransferase (AST) em animais dos grupos controle e tratado com 500/mg/kg/dia por 7 e 14 dias. O nível circulante da enzima nos animais dos grupos tratado foi reduzido apresentando diferenças significativas apenas nos grupos DNT e DHT tratados por 14 dias em relação aos grupos controle as comparações foram observadas entre os grupos DNC vs. DNT e DHC vs. DHT. Para os resultados foi realizado o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. Para comparação simples entre as duas colunas foi utilizado o Teste T Student. Para múltiplas comparações utilizou-se o teste Two way ANOVA com pós-teste de Tukey. Todas as análises e gráficos foram realizados utilizando o software GraphPad Prism 8.0, assumindo-se diferenças significativas de $p < 0,05$.



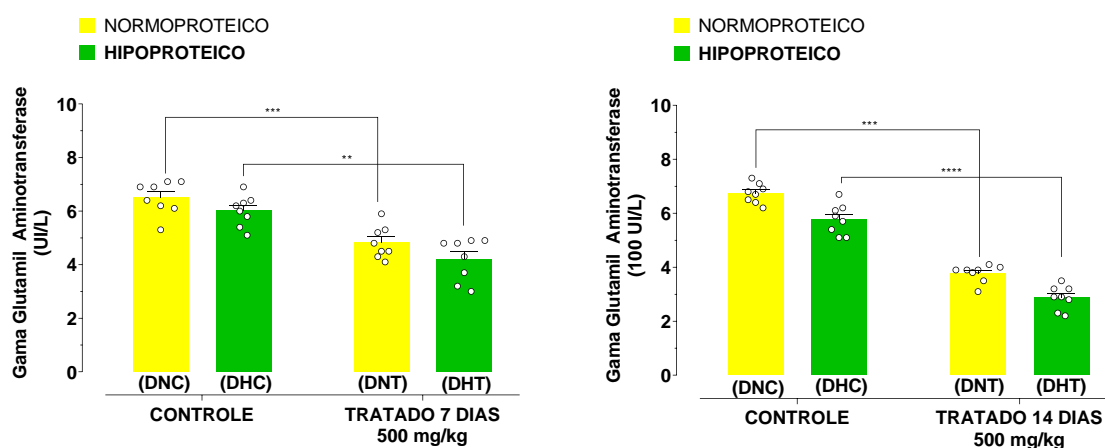
A literatura é assertiva em afirmar que doenças do fígado, tal como fígado gorduroso, doença hepática gordurosa alcoólica e cirrose aumentam os níveis de ALT e AST no soro (LIU et al., 2021). Outros autores afirmam que quando ocorrem danos hepatocelulares mais extensos, há a liberação de enzima mitocondrial que elevam os valores de AST e ALT (GOLDMAN; SCHAEFER, 2016; NNA; BAKAR; MOHAMED, 2018; OLIVEIRA; NAGEM; RIBEIRO, 2005).

Os achados de Oliveira, Nagem e Ribeiro (2005) indicaram que o extrato aquoso da própolis não eleva os índices de ALT e AST e, portanto, possui baixa hepatotoxicidade. Do mesmo modo, os achados de El Menyiy e colaboradores (2018) indicaram que o extrato aquoso da própolis foi capaz de preservar a produção sérica de Aspartato Aminotransferases e a eletroforese de proteínas. Esses resultados podem indicar, inclusive, que as substâncias presentes da própolis verde possuem efeito hepatoprotetor, potencializados pela biotecnologia de administração por nanoesferas de extrato aquoso de própolis. Como já citado na revisão teórica, essa tecnologia permite a administração contínua das substâncias terapêuticas, proporcionando uma melhor absorção delas por um período de tempo mais longo.

7.6.3 Gama Glutamil Transferase (GGT)

A Gama glutamil transferase (GGT) é uma enzima que tem uma grande importância no interior dos hepatócitos e vias biliares. O tratamento com nanoesferas de própolis reduziu significativamente a atividade enzimática do GGT apenas no grupo hipoproteico tratado (DHT) e no tempo de 07 dias, quando comparado ao seu grupo controle (DNT) (Figura 11). Já no tempo de 14 dias, observou-se redução da atividade enzimática tanto no grupo normoproteico tratado (DNT14) quanto no grupo hipoproteico tratado (DHT14), indicando um expressivo efeito da própolis nesse parâmetro nos animais tratados com as nanoesferas do extrato de própolis verde.

Figura 11 - Dosagem de Gama Glutamil Transferase (GGT) em animais dos grupos controle e tratado com 500/mg/kg/dia por 7 e 14 dias. O nível circulante da enzima nos animais dos grupos tratado foi reduzido apresentando diferenças significativas nos grupos tratados por 7 dias e 14 dias em relação aos grupos controle as comparações foram observadas entre os grupos DNC vs. DNT e DHC vs. DHT. Para os resultados foi realizado o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. Para comparação simples entre as duas colunas foi utilizado o Teste T Student. Para múltiplas comparações utilizou-se o teste Two way ANOVA com pós-teste de Tukey. Todas as análises e gráficos foram realizados utilizando o software GraphPad Prism 8.0, assumindo-se diferenças significativas de $p < 0,05$.



Oliveira, Nagem e Ribeiro (2005) investigaram os efeitos da própolis nos níveis séricos de ALS, AST e GGT. Em sua pesquisa, os autores não notaram interferência significativa na atividade de GGT. De acordo com a literatura, disfunções hepáticas, principalmente aquelas ocasionadas pelo alcoolismo, costumam ser indicadas pelos altos níveis de GGT (GOLDMAN; SCHAEFER, 2016). Nossos resultados evidenciam o efeito hepatoprotetor que as nanoesferas podem exercer ao metabolismo hepático frente a uma desnutrição hipoproteica, os resultados apresentaram diferenças

significativas entre os grupos tratados com as nanoesferas de própolis verde.

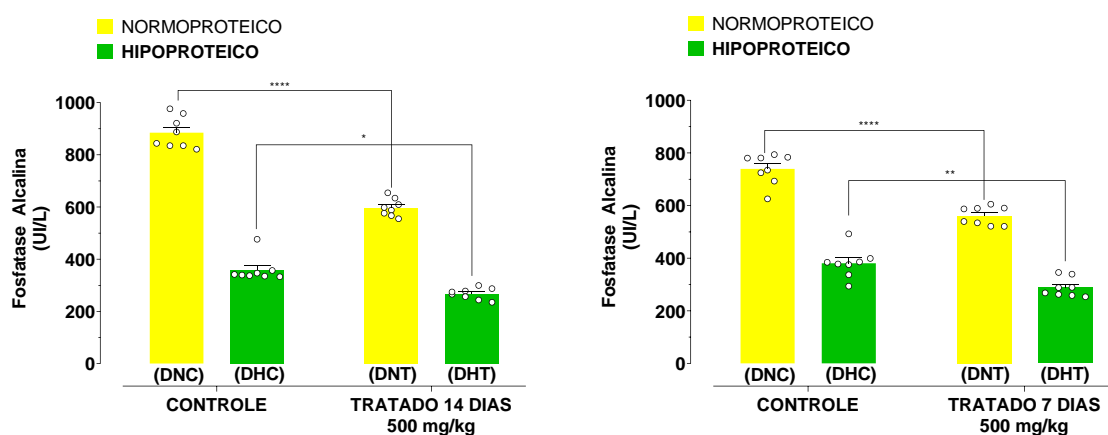
O GGT também pode ser alterado em face de alguns tipos de substâncias, mas considerando os achados deste nosso experimento, as substâncias presentes e preservadas pelas nanoesferas de própolis verde não estão entre as substâncias que provocam essas alterações. Dessa forma, diante dos dados obtidos pode-se inferir que a própolis produziu um efeito hepatoprotetor quando se consideramos esse parâmetro de avaliação funcional do órgão.

Além do exposto, nossos dados evidenciam que independentemente dos efeitos descritos, todos os animais apresentaram elevados níveis dessa enzima quando avaliados os níveis normais para essa espécie animal (LIMA et al., 2018; BRANCO et al., 2011). Observando trabalhos como o de Moura e colaboradores (2012), acredita-se que isso se deve à dieta baseada em AIN-93. Wildner e colaboradores (2017) afirmam que essa dieta pode ser responsável pelo ganho excessivo de peso nesses modelos o que explica em parte os níveis aumentados dessa molécula nos animais normoproteico.

7.6.4 Fosfatase alcalina

A Fosfatase Alcalina (FA) apresenta várias isoenzimas específicas responsáveis pela fosforilação de um grande número de moléculas. Nossos resultados evidenciam que o tratamento com as nanoesferas de própolis verde atuou sobre os grupos DNT e DHT, reduzindo a atividade da FA, tanto no tempo de 7 dias como no tempo de 14 dias pós-tratamento, quando comparados aos seus respectivos grupos controle (Figura 12).

Figura 12 - Dosagem de Fosfatase Alcalina (FA) em animais dos grupos controle e tratado com 500/mg/kg/dia por 7 e 14 dias. O nível circulante de FA nos animais dos grupos tratado foi reduzido apresentando diferenças significativas entre eles nos tempos de 7 e 14 dias em relação aos grupos controle as comparações foram observadas entre os grupos DNC vs. DNT e DHC vs. DHT. Para os resultados foi realizado o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. Para comparação simples entre as duas colunas foi utilizado o Teste T Student. Para múltiplas comparações utilizou-se o teste Two way ANOVA com pós-teste de Tukey. Todas as análises e gráficos foram realizados utilizando o software GraphPad Prism 8.0, assumindo-se diferenças significativas de $p < 0,05$.



A fosfatase alcalina (FA) é notada em altas quantidades no sangue quando há alguma alteração no tecido ósseo ou no tecido hepático. Nas neoplasias, os níveis de FA podem indicar a existência de metástases envolvendo o fígado ou os ossos (PINTO, 2017). No caso de doenças envolvendo o fígado, o mais comum é que o aumento de fosfatase alcalina seja um marcador de cirrose biliar (MARSHALL et al., 2016).

Na pesquisa promovida por El-Haskouri e colaboradores (2018) notou-se que o extrato de própolis combinado com mel foi capaz de reduzir os índices de fosfatase alcalina em roedores. Do mesmo modo, Laroussi e colaboradores (2021) constataram que a associação de própolis e mel possui efeito preventivo no aumento dos níveis plasmáticos da FA em camundongos. Esses resultados corroboram com os dados obtidos em nosso trabalho, onde em todos os grupos em que os animais foram tratados com as nanoesferas de própolis verde pôde-se observar uma redução significativa dos níveis de Fosfatase Alcalina, assemelhando-se com dados de Franchi e colaboradores.

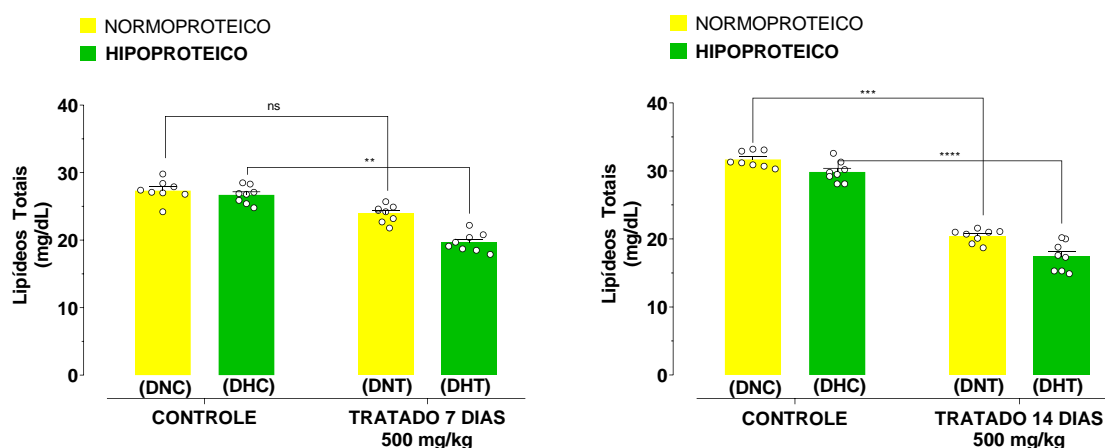
7.7 LIPIDOGRAMA

7.7.1 Lipídeos totais

O perfil lipídico é um conjunto responsável por detectar possíveis irregularidades no metabolismo, avaliando indicadores de risco de doenças cardíacas. Os resultados mostram uma redução significativa dos níveis lipídicos (LP) nos grupos tratados (DNT e DHT) nos tempos de 7 e 14 dias, quando comparados com os

respectivos grupos controle (Figura 13).

Figura 13 - Dosagem de Lipídeos Totais (LP) em animais dos grupos controle e tratado com 500mg/kg/dia por 7 e 14 dias. O nível de lipídeos totais nos animais dos grupos tratado foi reduzido apresentando diferenças significativas entre eles nos tempos de 7 e 14 dias em relação aos grupos controle as comparações foram observadas entre os grupos DNC vs. DNT e DHC vs. DHT. Para os resultados foi realizado o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. Para comparação simples entre as duas colunas foi utilizado o Teste T Student. Para múltiplas comparações utilizou-se o teste Two way ANOVA com pós-teste de Tukey. Todas as análises e gráficos foram realizados utilizando o software GraphPad Prism 8.0, assumindo-se diferenças significativas de $p < 0,05$.



Os resultados desta pesquisa confirmam os achados de Xu et al. (2020) envolvendo a própolis verde e seus efeitos sobre o perfil lipídico de camundongos. Entretanto, trabalhos como o de Ferreira e colaboradores (2006) evidenciaram que a dieta baseada em AIN-93 eleva o peso e a glicemia de roedores. Wildner e colaboradores (2017) afirmam que essa dieta pode ser a responsável pelo ganho excessivo de peso nesses modelos experimentais, o que pode ter interferido no resultado dos testes realizados nesta pesquisa.

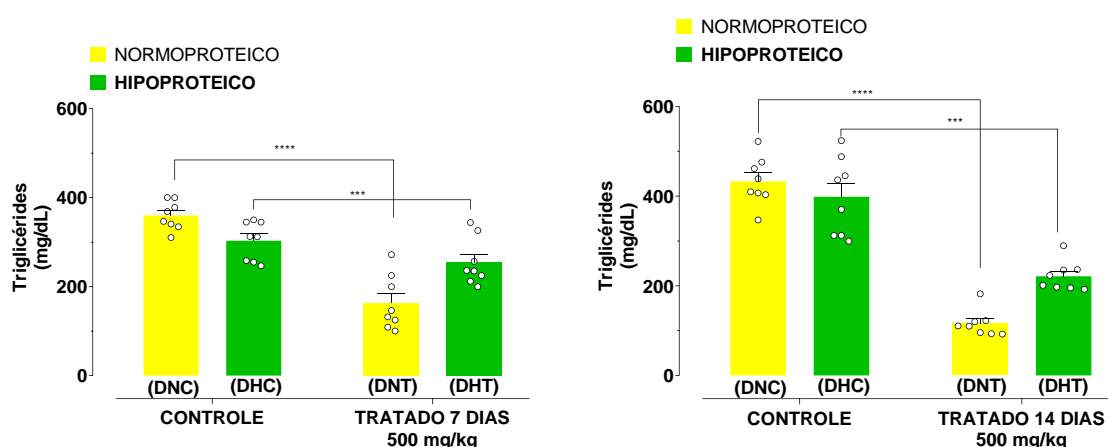
Estudos sobre o perfil lipídico apontam que substâncias antioxidantes possuem ação sobre o metabolismo lipídico inibindo a oxidação de lipoproteínas e consequentemente a proteção de outros eventos, essa alteração no metabolismo se dá pela presença de flavonoides presentes nas substâncias (CAMPO et al., 2007).

7.7.2 Triglicérides

Triglicérides são gorduras que estão presentes na corrente sanguínea e tem grande relação em síndromes metabólicas, sendo responsável por armazenar

energia. Os resultados apresentados (Figura 14) mostram uma redução significativa nos grupos tratado normoproteico (DNT) e hipoproteico (DHT) quando comparados aos seus respectivos grupos controle (DNC e DHC).

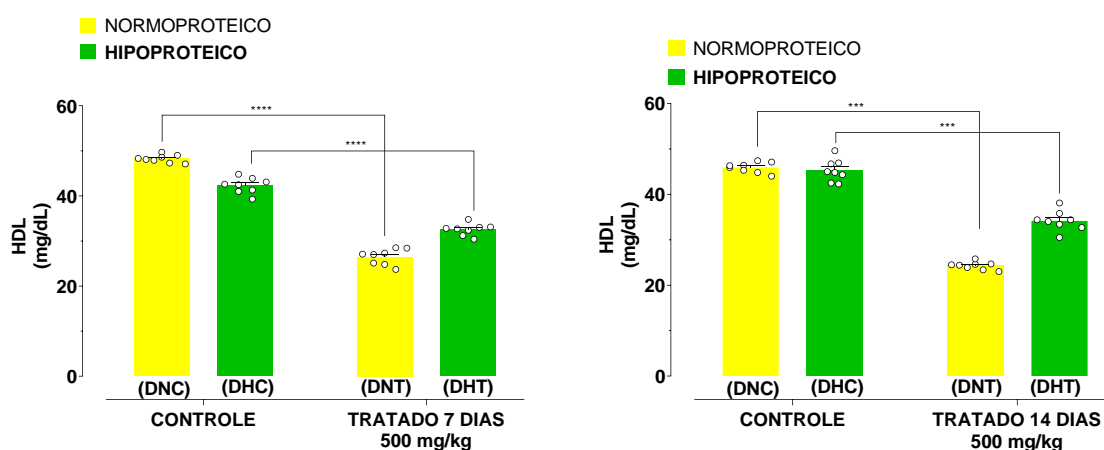
Figura 14 - Dosagem de Triglicérides em animais dos grupos controles e tratados com 500/mg/kg/dia por 7 e 14 dias. O nível de triglicérides nos animais dos grupos tratado foi reduzido apresentando diferenças significativas entre eles nos tempos de 7 e 14 dias em relação aos grupos controle as comparações foram observadas entre os grupos DNC vs. DNT e DHC vs. DHT. Para os resultados foi realizado o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. Para comparação simples entre as duas colunas foi utilizado o Teste T Student. Para múltiplas comparações utilizou-se o teste Two way ANOVA com pós-teste de Tukey. Todas as análises e gráficos foram realizados utilizando o software GraphPad Prism 8.0, assumindo-se diferenças significativas de $p < 0,05$.



7.7.3 HDL – Lipoproteína de Alta Densidade

A principal função do HDL é remover o excesso de colesterol livre e conduzi-lo até o fígado, exercendo um importante papel no metabolismo celular. Os resultados apresentados mostram uma redução significativa nos níveis desse marcador para os grupos tratados normoproteicos (DNT) e hipoproteicos, (DHT), quando comparados aos seus respectivos grupos controle (DNC e DHC) em ambos os tempos avaliados (Figura 15).

Figura 15 - Dosagem de HDL em animais dos grupos controles e tratados com 500/mg/kg/dia por 7 e 14 dias. O nível circulante de HDL nos animais dos grupos tratado foi reduzido apresentando diferenças significativas entre eles nos tempos de 7 e 14 dias em relação aos grupos controle as comparações foram observadas entre os grupos DNC vs. DNT e DNT vs. DHT. Para os resultados foi realizado o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. Para comparação simples entre as duas colunas foi utilizado o Teste T Student. Para múltiplas comparações utilizou-se o teste Two way ANOVA com pós-teste de Tukey. Todas as análises e gráficos foram realizados utilizando o software GraphPad Prism 8.0, assumindo-se diferenças significativas de $p < 0,05$.



Em pesquisa recente Silva e colaboradores (2021) elaboraram uma revisão teórica a respeito dos benefícios da própolis para a saúde cardiovascular. Um ponto importante do estudo trata do efeito anti-aterosclerótico da própolis. Segundo os revisores, a própolis possui a capacidade de modular o perfil de lipoproteínas séricas, dentre outras atividades.

Tian e colaboradores (2015) constataram que a própolis é capaz de suprimir a captação de lipoproteínas (HDL). Li e colaboradores (2012), também trabalhando com a própolis, encontraram a diminuição da taxa de síntese hepática de triglicerídeos e a diminuição do conteúdo hepático de colesterol, além de controlar a glicose no sangue. De forma semelhante, Ichi e colaboradores (2009) verificaram que a administração de própolis diminuiu o acúmulo de gordura, triglicerídeos e colesterol em camundongos submetidos à dieta rica em carboidratos e gorduras.

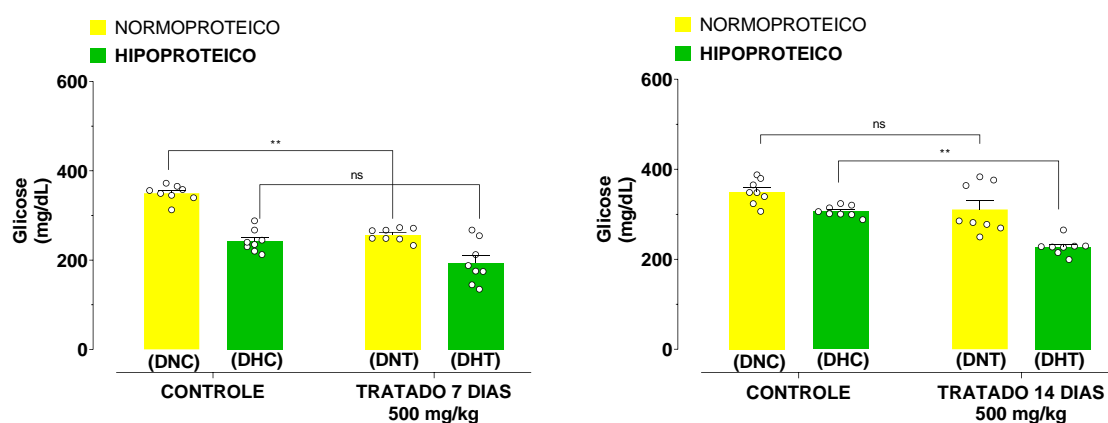
Adicionalmente, nossos dados revelam que os valores atribuídos aos grupos controle apresentam-se consideravelmente alterados, se comparados aos valores obtidos em outras pesquisas como os de Lima, (2018) e aos indicadores de valor de referência para roedores no Help de Exames veterinários de pesquisa e desenvolvimento do Laboratório Hermes Pardini (Figura 15). Essas alterações podem ser atribuídas à ração AIN-93, já reconhecida por sua interferência no aumento da glicose e demais padrões bioquímicos em análise nesta pesquisa.

7.8 GLICOSE

A glicose é um carboidrato do grupo dos monossacarídeos e tem grande

importância no processo de respiração celular e no fornecimento de energia no organismo. Foram mensurados os níveis circulantes de glicose nos tempos de 7 e 14 dias (Figura 16). Nossos resultados demonstraram que houve uma redução significativa nos níveis de glicose dos animais dos grupos tratado (DNT) no tempo de 7 dias apenas e nos animais do grupo (DHT) tratados por 14 dias em relação ao grupo controle (DNC e DHC) tratados tempo de 7 dias onde não houve resultado significativos nos animais tratados no tempo de 7 dias.

Figura 16 - A dosagem de glicose nos tempos de 7 dias e 14 dia nos animais dos grupos tratado foi reduzido apresentando diferenças significativas entre eles nos tempos de 7 e 14 dias em relação aos grupos controle as comparações foram observadas entre os grupos DNC vs. DNT e DHC vs. DHT. Para os resultados foi realizado o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. Para comparação simples entre as duas colunas foi utilizado o Teste T Student. Para múltiplas comparações utilizou-se o teste Two way ANOVA com pós-teste de Tukey. Todas as análises e gráficos foram realizados utilizando o software GraphPad Prism



Nota-se o nível elevado de glicose constante nos resultados deste nosso experimento. Acredita-se que este resultado pode estar relacionado ao tipo de dieta a que o grupo controle foi submetido, no caso, AIN-93. Trabalhos como o de Ferreira e colaboradores (2006) evidenciaram que a dieta baseada em AIN-93 eleva o peso e a glicemia de roedores. Wildner e colaboradores (2017) afirmam que essa dieta pode ser responsável pelo ganho excessivo de peso nesses modelos.

Ainda assim, a redução percebida em nosso trabalho encontra-se alinhada com os achados de Kitamura e colaboradores (2013), os quais verificaram que a própolis brasileira reduz os níveis de glicose no sangue, bem como os níveis de colesterol plasmático. Eles atribuem isso ao efeito da própolis nas células imunes do tecido adiposo. Uma vez que a própolis atua como antioxidante, ela melhora a capacidade

hepática de regular a homeostase da glicose (SON et al., 2011). A regulação consiste em liberar mais glicose para a produção de energia ou armazená-la em forma de glicogênio no fígado, retirando-a de circulação no sangue.

7.9 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DO FÍGADO

De acordo com Schimoni (2006), o fígado é responsável pelo desempenho de inúmeras funções importantes para o organismo. Ele é essencial para a regulação do metabolismo de proteínas, desempenhando a função de metabolização da maioria das substâncias que poderiam ocasionar hepatotoxicidade quando relacionadas ao uso de substâncias químicas, medicamentos e consumo alcoólico.

Em distintas condições patológicas associadas a distúrbios metabólicos ou ao consumo excessivo de álcool ou uso de drogas e metais pesados, os hepatócitos que são as células parenquimatosas do fígado acumulam, na maioria dos quadros avaliados, grande quantidade de lipídeos em seu citoplasma gerando um quadro conhecido como esteatose hepática (VINKEN et al, 2006).

A análise histopatológica do fígado dos animais se deu através de uma avaliação descritiva, entre os grupos controle normoproteico (DNC) e o grupo hipoproteico (DHC). Também foram avaliados os efeitos do tratamento entre os grupos (DNT) e (DHT) com as nanoesferas do extrato aquoso da própolis verde nos tempos de 7 e 14 dias pós estabelecimento das dietas.

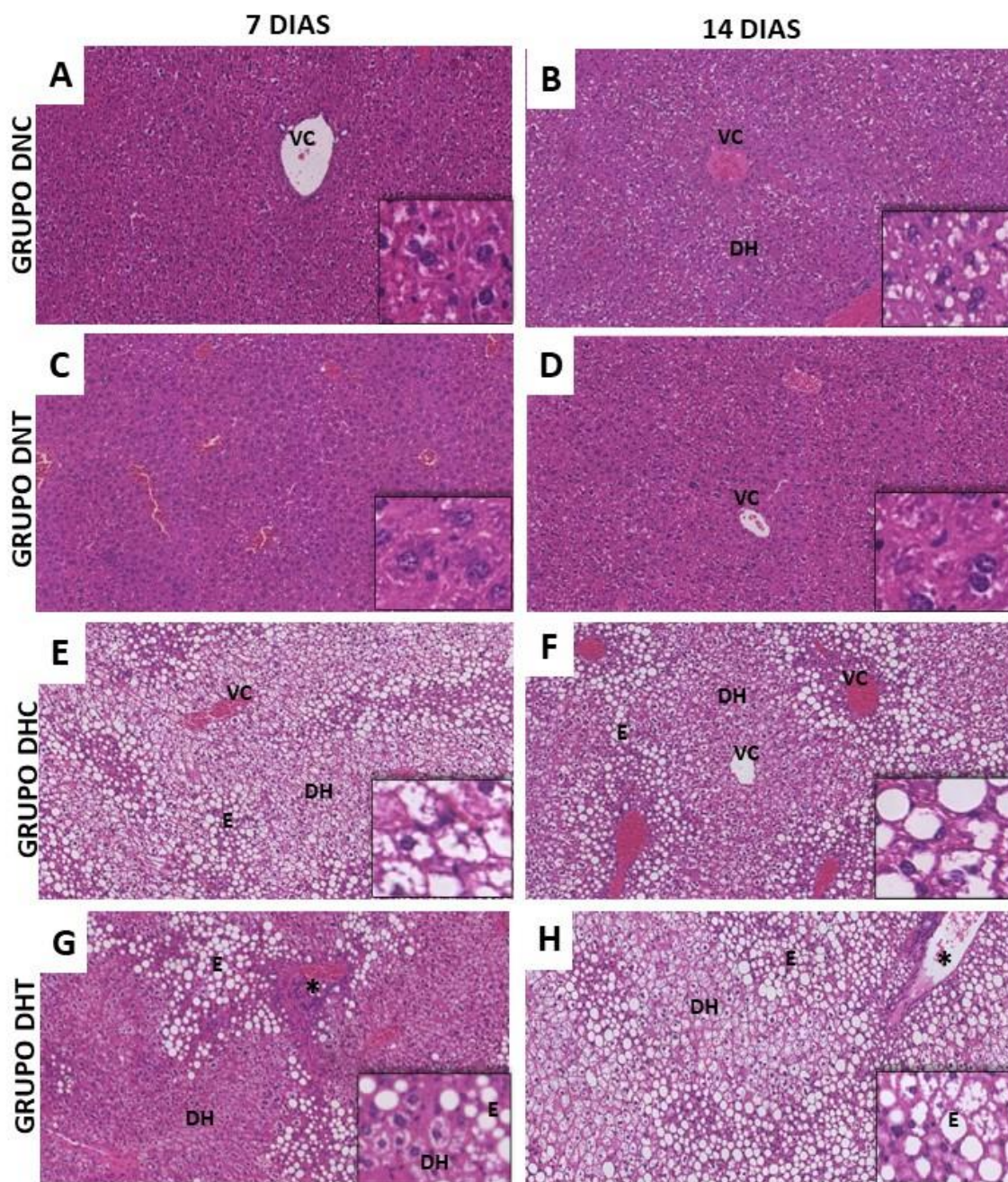
Dessa forma, serão descritas a seguir as alterações histomorfológicas do fígado o efeito do tratamento sobre este órgão (Figura 17).

De maneira geral a arquitetura hepática exibiu alterações degenerativas e vasculares evidentes quando comparados os grupos normoproteico e hipoproteico tanto no tempo de 7 como de 14 dias. Estas mesmas evidências também foram observadas em relação aqueles animais que receberam o tratamento e em ambos os tempos avaliados.

As alterações hepáticas foram consideradas de grau leve a severo, especialmente naqueles animais cuja dieta consistia em um teor de proteico de 3%. As lesões se caracterizavam por achados celulares de degeneração hidrópica e esteatose (Figura 17; E, F, G, H).

A degeneração hidrópica ou vacuolar é uma lesão celular reversível, devido ao acúmulo de água e eletrólitos no citoplasma e nas organelas celulares, por distúrbio hidroeletrólítico, tornando-as volumosas e tumefeitas (LIANG, et al., 2007).

Figura 17 - Cortes histológicos de Fígado evidenciando alterações histopatológicas degenerativas e vasculares no parênquima hepático. Fig. (A): grupo DNC tempo de 7 dias; Fig. (B): grupo DNC tempo de 14 dias; Fig. (C): grupo DNT tempo de 7 dias; Fig. (D): grupo DNT tempo de 14 dias; Fig. (E): grupo DHC tempo de 7 dias; Fig. (F): grupo DHC tempo de 14 dias; Fig. (G): grupo DHC tempo de 7 dias; Fig. (H): grupo DHC tempo de 14 dias. (*) = Triáde portal; (DH)=Degeneração Hidrópica; (E)= Esteatose; (VC)= Veia Centrolobular. Coloração H/E, aumento de 10X. Insete: Zoom em aumento de 20X.



Fonte: Dados da pesquisa

A tumefação celular pode ser desencadeada por diferentes agentes agressores (físicos, químicos, biológicos), que levam a um aumento da concentração de sódio e redução da concentração de potássio intracelulares, com aumento da pressão osmótica intracelular, favorecendo, por seu lado, a entrada de água nas células e, conseqüentemente, o aumento de volume isosmótico celular, por comprometimento funcional das bombas eletrolíticas (enzimas) nas membranas celulares, responsáveis pelas concentrações diferenciadas dos eletrólitos, intra e extracelulares (PATOLOGIA, 2000; PAROLIN; REASON, 2001).

Esse perfil morfológico celular descrito promove um desarranjo da arquitetura padrão dos cordões de hepatócitos, o que conseqüentemente altera a pressão vascular nos capilares sinusoidais levando a um quadro de congestão e hipertensão portal (Figura. 17).

A esteatose é o acúmulo de lipídeos, no citoplasma de células que, usualmente, não os armazenam e ocorre comumente no fígado (SILVA; ESCANHOELA, 2009). Deve-se a interferências no metabolismo dos ácidos graxos, envolvendo maior captação, síntese ou dificuldades em utilizá-los, transportá-los ou excretá-los. Pode ser causada por medicamentos, intoxicações, infecções, hipoxemia, diabetes mellitus, distúrbios metabólicos, obesidade, hiperlipidemia, desnutrição, alcoolismo, entre outras causas (SILVA; ESCANHOELA, 2009).

Nos tecidos, quando se utiliza o processamento histológico químico, e a coloração pelo método da hematoxilina e eosina, a imagem histológica revela um espaço vazio onde havia lipídeos com morfologia celular caracterizada por células em forma de anel de sinete (Figura 17).

Posto isto, as análises histopatológicas evidenciam que as nanoesferas do extrato aquoso da própolis verde tiveram um efeito hepatoprotetor naqueles animais tratados tanto para o tempo de 7 quanto para o tempo de 14 dias. O tratamento não foi capaz de impedir a manifestação das lesões, porém, foi capaz de reduzir a velocidade de expansão das lesões revelando algumas ilhas de hepatócitos íntegros nos grupos hipoproteicos tratados, diferentemente dos grupos não tratados, cujo parênquima hepático estava totalmente comprometido (Figura 17).

8 RESUMO DOS RESULTADOS

Principais Achados ↓	GRUPOS			
	DNC	DNT	DHC	DHT
Peso dos Animais	Ganho de peso	Ganho de peso	Perda de Peso	A nanoformulação proporcionou aumento de peso.
Proteínas Totais	Volume circulante aumentado nos tempos de 7 e 14 dias.	Volume circulante aumentado nos tempos de 7 e 14 dias.	Baixos níveis de Proteínas Totais nos tempos de 7 e 14 dias. Dieta com restrição de % proteica.	A nano proporcionou regulação nos níveis basais de proteínas totais em ambos os tempos de 7 e 14 dias. Dieta com restrição de % proteica.
Função Hepática: ALT,AST, GGT	Foi observado alterações hepáticas. Aumento da circulação das enzimas em nível basal. Valores acima do valor de referência em ambos os tempos de 7 e 14 dias.	A nano proporcionou redução nos níveis basais das enzimas hepáticas nos tempos de 7 e 14 dias.	Foi observado alterações hepáticas. Aumento da circulação das enzimas em nível basal. Valores acima do valor de referência em ambos os tempos de 7 e 14 dias.	A nano proporcionou redução nos níveis basais das enzimas hepáticas nos tempos de 7 e 14 dias.
Fosfatase Alcalina	Níveis elevados de FA em ambos os tempos de 7 e 14 dias.	Diminuição dos níveis de FA após administração do tratamento em ambos os tempos de 7 e 14 dias.	Níveis elevados de FA em ambos os tempos de 7 e 14 dias.	Diminuição dos níveis de FA após administração do tratamento em ambos os tempos de 7 e 14 dias.
Lípidos Totais	Níveis elevados de LP em ambos os tempos de 7 e 14 dias.	A nano proporcionou redução nos lipídeos em ambos os tempos de 7 e 14 dias.	Níveis elevados de LP em ambos os tempos de 7 e 14 dias.	A nano proporcionou redução nos lipídeos em ambos os tempos de 7 e 14 dias.
Triglicérides	Níveis elevados de em ambos os tempos de 7 e 14 dias.	Diminuição dos níveis de triglicérides após administração do tratamento em ambos os tempos de 7 e 14 dias.	Níveis elevados de em ambos os tempos de 7 e 14 dias.	Diminuição dos níveis de triglicérides após administração do tratamento em ambos os tempos de 7 e 14 dias.
HDL	Níveis elevados de em ambos os tempos de 7 e 14 dias.	Diminuição dos níveis de HDL em ambos os tempos de 7 e 14 dias após o tratamento.	Níveis elevados de em ambos os tempos de 7 e 14 dias.	Diminuição dos níveis de HDL em ambos os tempos de 7 e 14 dias após o tratamento.
Glicose	Níveis elevados de em ambos os tempos de 7 e 14 dias.	Níveis elevados de em ambos os tempos de 7 e 14 dias.	Níveis elevados de em ambos os tempos de 7 e 14 dias.	Níveis elevados de em ambos os tempos de 7 e 14 dias.

Tabela 3 – Resumo das análises bioquímicas dos animais de experimentação

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A própolis coletada apresentou características organolépticas com a cor verde, com um aroma “*sui generis*” muito presente e marcante, apresentando também uma boa maleabilidade. A própolis coletada na fazenda camponesa, atende aos parâmetros de classificação da própolis verde indicado pelo MAPA e, portanto, pode ser considerada de excelente qualidade.

O extrato aquoso foi capaz de extrair os compostos químicos da própolis, concentração de flavonoides encontrada no extrato aquoso de própolis indicou a presença de valores exigidos pelo Ministério da Agricultura, atendendo aos requisitos mínimos.

A eficiência das nanoesferas em uma formulação é um parâmetro crucial para avaliar a retenção do princípio ativo e a capacidade de liberação. Os valores da caracterização química das nanoesferas de própolis verde permanecem entre 0 e 0,300 para indicando uma estabilidade e distribuição homogênea.

Ao realizar a avaliação de parâmetros importantes, tais como a média de peso e os níveis séricos de proteínas, concluiu-se que o modelo experimental de desnutrição hipoproteica aqui empregado mostrou-se eficiente para a finalidade do estudo proposto.

O conjunto de dados bioquímicos que avalia a função hepática (ALT, AST, GGT e Fosfatase Alcalina) indicou que, de modo geral, a administração de nanoesferas de própolis verde induziu alterações significativas no perfil bioquímico dos animais, se comparados aos seus respectivos grupos controle. Houve significativa redução dos níveis séricos das enzimas ligadas à função hepática, possibilitando inferir que o tratamento exerceu efeito hepatoprotetor.

Os dados do perfil lipídico (lipídeos totais, triglicérides e HDL) exibiram redução nos níveis séricos após a suplementação com as nanoesferas de própolis verde, indicando a capacidade de modulação metabólica da substância nesse parâmetro.

Foi possível observar que, nos grupos de animais desnutridos, as nanoesferas contendo extrato aquoso de própolis verde reduziu os níveis de glicose sérica.

Por fim, os resultados revelaram que a administração oral de nanoesferas de extrato aquoso da própolis verde mostrou-se capaz de exercer efeito sobre diferentes marcadores do perfil metabólico de animais submetidos à restrição de acesso à proteína. Pode-se ainda inferir que os efeitos da própolis verde podem ser observados

nesses animais independentemente do estado nutricional em que se encontram.

As análises histopatológicas evidenciam que as nanoesferas do extrato aquoso da própolis verde tiveram um efeito hepatoprotetor naqueles animais tratados tanto para o tempo de 7 quanto para o tempo de 14 dias. O tratamento não foi capaz de impedir a manifestação das lesões, porém, foi capaz de reduzir a velocidade de expansão das lesões.

Apesar dos aspectos elencados, a presente pesquisa demonstrou as limitações indicando a necessidade de realizar novos experimentos com outro tipo de ração que não altere tanto o perfil bioquímico.

Há também a necessidade de ampliação e aprofundamento das pesquisas a fim de se compreender com mais detalhes os mecanismos de ação da própolis verde e das nanoesferas isoladamente sobre os marcadores a avaliados.

REFERÊNCIAS

- AHN, M. R., et al. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. **Food Chem.**, v. 101, n. 4, p. 1383-1392, 2007.
- ATTWOOD, David. Sistemas dispersos. In: AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 4. ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.
- AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 4. ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.
- BAJERSKI, L. The use of Brazilian vegetable oils in nanoemulsions: an update on preparation and biological applications. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.52, n.3, p. 347–363, 2016. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjps/a/bSnHqfWgkWSjrFMz4gZx47K/?format=pdf&lang=en> Acesso em 15 abr. 2022.
- BARBOSA, Maria Denise de Saraiva. **Risco nutricional e desnutrição: prevalência e fatores associados em crianças menores de cinco anos**. 2008. 64 fls. Dissertação (Mestrado em Saúde da Criança e do Adolescente). Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2008
- BANSKOTA, A. H. Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. **J. Ethnopharmacol.**, v. 72, p. 239-246, 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0378-8741\(00\)00252-x](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(00)00252-x). Acesso em: 12 ago. 2022.
- BASNET, P., MATSUNO, T., NEIDLEIN, R. Potent free radical scavenging activity of propolis isolated from Brazilian propolis. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 52 (11/12), p. 828-833, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1515/znc-1997-11-1217>. Acesso em: 12 ago. 2022.
- BRAIK, A. *et al.* Myocardial protection by propolis during prolonged hypothermic preservation. **Cryobiology**, v. 88, p. 29-37, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16254262>. Acesso em: 16 jun. 2022.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. **Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001**. Aprova os regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geléia Real, Geléia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis, conforme consta dos Anexos desta Instrução Normativa. Publicado no Diário Oficial da União de 23/01/2001, Seção 1, Página 18.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Estratégias para o cuidado da pessoa com doença crônica: obesidade**. Departamento de Atenção Básica. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.
- BUFF, Caroline de Gouveia *et al.* Frequência de síndrome metabólica em crianças e adolescentes com sobrepeso e obesidade. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 25, n.

3, p. 221-226, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0103-05822007000300005>. Acesso em: 18 jun. 2022.

CARLUCCI, A.; BREGNI, C. Productos Nanotecnológicos de Aplicación en Farmacoterapia. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.03, n.28 pp.470-477, 2009. Disponível em: http://www.latamjpharm.org/trabajos/28/3/LAJOP_28_3_3_1_NF31UDGVCE.pdf Acesso em 10 abr.2022.

CASTALDO, M., CAPASSO, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Journal of phytotherapy**, v.73, n.1, pp.1-6, 2002. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/aib/a/FmZNzDD5zCqQCBjMmcgdJmf/?format=pdf&lang=pt> . Acesso em: 16 abr. 2022.

CHOPRA, S. *et al.* Propolis protects against doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats. **Exp Mol Pathol.**; v. 62, n. 3, p. 190-8, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/exmp.1995.1021>. Acesso em: 16 jun. 2022.

COLLARES, G. B.; PAULINO, Urquiza Helena Meira. Proteína C reativa: histórico e aplicações atuais. **Revista Médica de Minas Gerais**, Belo Horizonte-MG, v. 16, p. 227-233, 2006.

CUPPARI, Lilian. **Nutrição**: nutrição clínica no adulto. São Paulo: Manole, 2002.

DURÁN, Nelson; AZEVEDO, Marcelo M. M. **O que é nanobiotecnologia**: atualidades e perspectivas. 2002. Disponível em: <https://www.comciencia.br/dossies-1-72/reportagens/nanotecnologia/nano20.htm>. Acesso em 22 jan. 2022.

ECCLESTON, Gillian M. Emulsões e cremes. In: AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 4. ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

EL-HASKOURY R., *et al.* Antioxidant Activity and Protective Effect of Carob Honey in CCI 4-induced Kidney and Liver Injury. **Arch Med Res**. 49, v. 5, p. 306–313. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2018.09.011>. Acesso em 16 jun. 2022

EL MENYIY, N. *et al.* Evaluation of antiproteinuric and hepato-renal protective activities of propolis in paracetamol toxicity in rats. **Nutr Res Pract**. 2018, v. 12, n. 6, p. 535-540. Disponível em: <https://doi.org/10.4162/nrp.2018.12.6.535>. Acesso em: 14 jun. 2022.

FALCÃO, S. I. *et al.* (2019). In vitro interactions of moroccan propolis phytochemical's on human tumor cell lines and anti-inflammatory properties. **Biomolecules**, v. 9, n. 8, p. 315. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/biom9080315>. Acesso em: 22 ago. 2022.

FAROOQUI, Tahira; FAROOQUI, Akhlaq A. Molecular mechanism underlying the therapeutic activities of propolis: a critical review. **Current Nutrition & Food Science**, v. 6, n. 3, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/157340110792389136>. Acesso em: 27 jun. 2021.

FERREIRA, F. R., *et al.* Effect of feed restriction on learning, memory and stress of rodents, **Bioscience Journal**, Uberlândia, MG, v. 22, n. 1, 2006. Disponível em: <https://seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/6644>. Acesso em: 16 jun. 2022.

FERREIRA, Lillian das Neves. **Capacidade imunomoduladora de extratos etanólico de própolis verde e aquoso de própolis marrom em camundongos inoculados com antígenos múltiplos**. 2009. 59 f. Dissertação (Mestrado em Veterinária) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2009. Disponível em: <http://guaiaca.ufpel.edu.br:8080/handle/123456789/2549>. Acesso em: 18 jun. 2022.

FESSI, H. *et al.* Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, n. 1, p. R1-R4, 1989 . Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(89\)90281-0](https://doi.org/10.1016/0378-5173(89)90281-0). Acesso em: 18 jun. 2022.

FRANÇA, Arieli Zibetti *et al.* Própolis: diferentes tipos e usos. 21 maio 2020. **SB Rural**, ed. 245, ano 12. Disponível em https://www.udesc.br/arquivos/ceo/id_cpmenu/1043/SB_245_15901745775696_1043.pdf. Acesso em 12 jun. 2022.

GHEISARI, A; SHAHRVAND, S; LANDY, N. Effect of ethanolic extract of propolis as an alternative to antibiotics as a growth promoter on broiler performance, serum biochemistry, and immune responses. **Vet World**, v. 10, n. 2, p. 249-254, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5352853/>. Acesso em 15 jun. 2022.

GOLDMAN, L.; SCHAEFER, A. I. **Goldman-Cecil: Tratado de medicina interna**. 25. ed. Barcelona: Elsevier, 2016.

GOURION, B. *et al.* Rhizobium-legume symbioses: the crucial role of plant immunity. **Trends Plant Sci.**, v. 20, n. 3, p. 186-94, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25543258/> Acesso em: 04 mar. 2022.

GUIZARDI, Francini Lube *et al.* Participação da comunidade em espaços públicos de saúde: uma análise das conferências nacionais de saúde. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**, v. 14, n. 1, p. 15-39, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0103-73312004000100003>. Acesso em: 18 jun. 2022.

GURMINI, J. *et al.* Desnutrição intrauterina e suas alterações no intestino delgado de ratos Wistar ao nascimento e após a lactação. **Bras Patol Med Lab**, v. 41, n.4, p. 271-278, 2005. <https://doi.org/10.1590/S1676-24442005000400009> . Disponível em : <https://www.scielo.br/j/jbpm/a/cfhk9SPFRJqd8tHfJ8TtJZv/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em : 11 abr. 2022.

HEGAZI, R. A.; WISCHMEYER, P. E. Clinical review: optimizing enteral nutrition for critically ill patients - a simple data-driven formula. **Society of Critical Care Medicine (SCCM) and American Society for parenteral and Enteral Nutrition (A.S.P.E.N.)**, v.15, n.6, pp.234-238, 2011. Doi: 10.1186/cc10430 . Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22136305/>. Acesso em: 04 mar. 2022.

HEGAZY, A. M. *et al.* Hypolipidemic and hepatoprotective activities of rosemary and thyme in gentamicin-treated rats. **Human and Experimental Toxicology**, v. 37, n. 4, p. 420–430, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/0960327117710534>. Acesso em 16 jun. 2022.

ICHI, I. *et al.* The beneficial effect of propolis on fat accumulation and lipid metabolism in rats fed a high-fat diet. **J Food Sci**, v. 74, p. H127-31, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01147.x>. Acesso em 16 jun. 2022

KALANTAR-ZADEH *et al.* Appetite and inflammation, nutrition, anemia, and clinical outcome in hemodialysis patients. **Am J Clin Nutr.**, v. 80, n. 2, p. 299-307, 2004. Disponível: <https://doi.org/10.1093/ajcn/80.2.299>. Acesso em: 18 jun. 2022

KALANTAR-ZADEH, K., *et al.* A malnutrition-inflammation score is correlated with morbidity and mortality in maintenance hemodialysis patients. **Am J Kidney Dis.**, v. 38, n. 6, p. 1251-63, 2001. Disponível: <https://doi.org/10.1053/ajkd.2001.29222>. Acesso em: 18 jun. 2022.

KALOGEROPOULOS, N. *et al.* Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. **Food Chem.** v. 116, n. 2, p. 452-461, 2009.

KITAMURA, H., *et al.* Beneficial effects of brazilian propolis on type 2 diabetes in ob/ob mice: possible involvement of immune cells in mesenteric adipose tissue. **Adipocyte**, v. 2, n. 4, p. 227-236, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.4161/adip.25608>. Acesso em: 16 jun. 2022.

KUBILIENE, L. *et al.* Alternative preparation of propolis extracts: comparison of their composition and biological activities. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 1, p. 156, 2015. Doi: 10.1186/s12906-015-0677-5. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26012348/>. Acesso em: 26 jun. 2021.

KUMAZAWA S, *et al.* Antioxidant Prenylated Flavonoids from Propolis Collected in Okinawa, Japan. **J Agric Food Chem.**, v. 55, n. 19, p. 7722–7725, 2007.

LAAROUSSI, H. *et al.* Protective Effect of Honey and Propolis against Gentamicin-Induced Oxidative Stress and Hepatorenal Damages. **Oxid Med Cell Longev**, n. 9719906, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8433017/>. Acesso em: 16 jun. 2022

LADU, J. L. C., ATHIBA, A. L., LUKAW, Y. S. Impact of Malnutrition on Children Less Than Five Years of Age in Juba Payam (District), Republic of South Sudan. **American Journal of Food and Nutrition**. 2018, v. 6, n. 4, 103-107, 2018. Disponível em: <http://pubs.sciepub.com/ajfn/6/4/2/index.html>. Acesso em 18 jun. 2022.

LI, Y., *et al.* Effects of Encapsulated Propolis on Blood Glycemic Control, Lipid

Metabolism, and Insulin Resistance in Type 2 Diabetes Mellitus Rats. **Evid. Based Complement. Altern. Med.**, v. 2012, p. 1–8, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2012/981896>. Acesso em: 16 jun. 2022.

LIANG, D. et al. Cytotoxic edema: mechanisms of pathological cell swelling. **Neurosurg Focus**, v. 22, n. 5, p. E2, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.3171%2Ffoc.2007.22.5.3>. Acesso em: 21 ago. 2022.

LIU, H. et al. Bioactive components and mechanisms of popular propolis in inhibiting proliferation of human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. **Biomed Pharmacother**. 2021 v. 144, n. 112364. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112364>. Acesso em: 14 jun. 2022.

LIMA, L. D. C. **Efeito da própolis verde nos componentes angiogênico, inflamatório e fibrogênico em modelo murino de aderência intraperitoneal**. 2012. 90 fls. Dissertação (Mestrado em Patologia), Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil. Disponível em: <https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/BUBD-9EGMAL>. Acesso em: 09 jul. 2022.

LUSTOSA, Sarah R. et al. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 2008, v. 18, n. 3, p. 447-454, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2008000300020>. Acesso em: 18 jun. 2022.

MANI, F. et al. Propolis: Effect of different concentrations, extracts and intake period on seric biochemical variables. **Journal of Ethnopharmacol**, v.105, n.7, pp. 95-98, 2005. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2008000300020> Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbfar/a/x4sTg6wQWMW6zNLKfdp5hDb/?format=pdf&lang=pt> Acesso em: 05 abr. 2022.

MANRIQUE, Antônio J; SANTANA, Weyder C. Flavonóides, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis de abelhas sem ferrão, *Melipona quadrifasciata*, *Melipona compressipes*, *Tetragonisca angustula* e *Nannotrigona* sp. do Brasil e da Venezuela. Tropa de Zootecnia. **Maracay**, v. 26, n. 2, p. 157-166, 2008. Disponível em http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-72692008000200010&lng=pt&nrm=iso. Acesso em: 11 ago. 2022.

McCOWEN, K. C., BISTRAN, B. R. Immunonutrition: problematic or problem solving? **Am J Clin Nutr.**, v. 77, n. 4, p. 764-70, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/ajcn/77.4.764>. Acesso em: 18 jun. 2022

MARSHALL, William J. et al. **Bioquímica clínica: aspectos clínicos e metabólicos**. 3 .ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

MARZZOCO, A; TORRES, B. B; **Bioquímica básica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015

MIGUEL, M. G. et al. Phenols, flavonoids and antioxidant activity of aqueous and methanolic extracts of propolis (*Apis mellifera* L.) from Algarve, South Portugal. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 34, n. 1, p. 16–23, 2014. Disponível em:

<https://doi.org/10.1590/S0101-20612014000100002>. Acesso em: 12 jun. 2022.

MIRANDA, M. B. de *et al.* Hydroalcoholic extract of Brazilian green propolis modulates inflammatory process in mice submitted to a low protein diet. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 109, p. 610-620, jan. 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332218341623?via%3Dihub>. Acesso em: 25 fev. 2019.

MOLINA, Gustavo; PELISSARI, Franciele M.; FEIRHMANN, Andresa C. Consequências da desnutrição proteica para o trato gastrointestinal. **Arquivos do MUDI**, v. 13, n. 1/2/3, 2009. Disponível em: <https://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ArqMudi/article/view/20016>. Acesso em 15 jul. 2021.

MORGANE, P., MOKLER, D., GALLER, J. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 26, n. 4, p. 471-83, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(02\)00012-X](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(02)00012-X). Acesso em 18 jun. 2022.

MOURA, L.P. *et al.* Dietary restriction, caloric value and the accumulation of hepatic fat. **Lipids in health and disease**, v. 11, n. 2, 2012. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/20902>. Acesso em 16 jun. 2022.

MOURA, S. A. L *et al.* Aqueous extract of Brazilian green propolis: Primary components, evaluation of inflammation and wound healing by using subcutaneously implanted sponges. **Evid. Based Complement. Altern. Med.**, 2011. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2011/748283/>. Acesso em: 25 jun. 2021

MOYNIHAN, P.; PETERSEN, P. E. Diet, nutrition and the prevention of dental diseases. *Public Health Nutrition*, v.7, n. 1a, 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14972061/>. Acesso em: 20 jan. 2022.

MURRAY, C. J. *et al.* Global, regional, and national disability-adjusted life years (DALYs) for 306 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 188 countries, 1990-2013: quantifying the epidemiological transition. **Lancet**. v. 28; n. 386, p. 2145-91, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26321261/>. Acesso em: 18 jun. 2022.

NASSIR, F. *et al.* Effect of selenium deficiency on hepatic lipid and lipoprotein metabolism in the rat. **Br J Nutr.**, v. 78, p. 493–500, 1997.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014

NNA V., BAKAR A., MOHAMED, M. Malaysian propolis, metformin and their combination, exert hepatoprotective effect in streptozotocin-induced diabetic rats. **Life Sci**. 2018, v. 211, p. 40-50. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.09.018>. Acesso em 14 jun. 2022.

OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J.; RIBEIRO, J. N. Análise sérica das enzimas aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase e gama glutamiltranspeptidase de coelhos adultos tratados com extrato bruto de própolis. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, São Paulo, v. 26, n.1, p. 25-28, 2005. Disponível em: http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/Cien_Farm/article/view/395. Acesso em: 14 jun. 2022.

PATOLOGIA em hipertexto, 2000. Universidade Federal de Minas Gerais. Disponível em: <http://depto.icb.ufmg.br/dpat/old/tumefcell.htm>. Acesso em 27 ago. 2022.

PAROLIN, Mônica Beatriz; REASON, Iara J. Messias. Apoptose como mecanismo de lesão nas doenças hepatobiliares. **Arquivos de Gastroenterologia**. 2001, v. 38, n. 2, pp. 138-144, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0004-28032001000200011>. Acesso em: 25 ago. 2022

PINTO, Wagner de Jesus. **Bioquímica clínica**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

REEVES, P. G; NIELSEN, F. H; FAHEY, G. C. J. 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, pp.1939-1951, 1993.

RIBEIRO FILHO, Fernando F. *et al.* Gordura visceral e síndrome metabólica: mais que uma simples associação. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, n. 2, pp. 230-238, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0004-27302006000200009>. Acesso em: 18 jun. 2022.

ROCHA, A. C. F. **Desenvolvimento de nanoesferas contendo extrato das folhas de aleurites moluccanus L. Willd (euphorbiaceae) com atividade anti-inflamatória tópica**. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade do Vale do Itajaí. Itajaí, 2017. Disponível em: <http://siaibib01.univali.br/pdf/Anna%20Carolina%20Furaer%20da%20Rocha.pdf>. Acesso em: 21 jan. 2022.

SALEH, T. A.; ALAQAD, K. Environmental & Analytical Toxicology Gold and Silver Nanoparticles: Synthesis Methods, Characterization Routes and Applications towards Drugs. *J Environ Anal Toxicol*, v. 6, 2016.

SAKAY T. *et al.* Brazilian green propolis promotes weight loss and reduces fat accumulation in C57BL/6 mice fed a high-fat diet. **Biol Pharm Bull.**, v. 40, n. 4, p. 391–395, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1248/bpb.b16-00577>. Acesso em 15 jun. 2022.

SARTORI, G. *et al.* Protective effect of brown Brazilian propolis against acute vaginal lesions caused by herpes simplex virus type 2 in mice: involvement of antioxidant and anti-inflammatory mechanisms. **Cell Biochem. Funct**, v. 30, n. 1, p. 1-10, 2012. [10.1002/cbf.1810](https://doi.org/10.1002/cbf.1810)

SAWAYA, Ana Lydia. Alterações fisiopatológicas na desnutrição energético-proteica. **Nescon Biblioteca Virtual**, [S.l.], [S.d]. Disponível em: <https://www.nescon.medicina.ufmg.br/biblioteca/imagem/1552.pdf>. Acesso em: 17 jun. 2022.

SEIBERT, J. B. *et al.* Development of propolis nanoemulsion with antioxidant and antimicrobial activity for use as a potential natural preservative. **Food Chemistry**, 287, 61–67, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30857719/>. Acesso em: 22 jan. 2022.

SHIKORA, S. A. Special nutrients for gut feeding. In: SHIKORA, S. A.;BLACKBURN, G. L. **Nutrition support**. Theory and therapeutics. New York: Chapman & Hall, 1996.

SILVA, H., *et al.* The Cardiovascular Therapeutic Potential of Propolis-A Comprehensive Review. **Biology (Basel)**, v. 10, n. 1, 27, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7823408/>. Acesso em: 16 jun. 2022.

SILVA, Gustavo Henrique da; ESCANHOELA, Cecília Amélia Fazzio. Doença hepática gordurosa não alcoólica: patogênese e achados histológicos com ênfase nas alterações mitocondriais. **Rev. Ciênc. Méd.**, v. 18, n. 5, p. 269-279, 2009. Disponível em: <https://periodicos.puc-campinas.edu.br/seer/index.php/cienciasmedicas/article/viewFile/626/606>. Acesso em: 12 set. 2022.

SOARES, R.L., *et al.* The transition from malnutrition for obesity. **Journal of clinical**. v.5, n.1, p.64-68, 2013. Disponível em: https://www.mastereditora.com.br/periodico/20140429_2131532.pdf#page=64. Acesso em 20/07/2022.

SON, M. J., *et al.* Effect of oryzanol and ferulic acid on the glucose metabolism of mice fed with a high-fat diet. **J Food Sci.** v. 76, n. 1, p. H7-H10, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01907.x>. Acesso em: 16 jun. 2022.

TADROS, T. *et al.* Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108-109, p. 303-318, 2004.

TEIXEIRA, et al. Plant Origin of Green Propolis: Bee Behavior, Plant Anatomy and Chemistry. **Evid Based Complement Alternat Med.** v. 2, n. 1, p. 85-92. Disponível em: <https://doi.org/10.1093%2Fecam%2Fneh055>. Acesso em: 28 ago. 2022.

TIAN, H. *et al.* Ethanol extract of propolis protects macrophages from oxidized low density lipoprotein-induced apoptosis by inhibiting CD36 expression and endoplasmic reticulum stress-C/EBP homologous protein pathway. **BMC Complement. Altern. Med.** v. 15, n. 230., 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12906-015-0759-4>. Acesso em: 16 jun. 2022.

UNICEF. **Relatório da ONU**: ano pandêmico marcado por aumento da fome no mundo. 12 jul. 2021. Disponível em: <https://www.unicef.org/brazil/comunicados-de-imprensa/relatorio-da-onu-ano-pandemico-marcado-por-aumento-da-fome-no>

mundo. Acesso em: 18 jun. 2022.

VARELLA, Dráuzio. Síndrome metabólica. **Biblioteca Virtual em Saúde**, out. 2017. Disponível em: <https://bvsm.s.saude.gov.br/sindrome-metabolica/>. Acesso em: 18 jun. 2022.

VASCONCELOS, Maria Izabel Lamounier de; TIRAPEGUI, Julio. Aspectos atuais na terapia nutricional de pacientes na Unidade de Terapia Intensiva (UTI). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 1, pp. 23-32, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1516-93322002000100003>. Acesso em: 12 jul. 2022.

VECCHI, E.; DRAGO, L. Propolis' antimicrobial activity: what's new? **Infez Med.**, n. 15, pp. 7-15, 2007. Disponível em: https://www.infezmed.it/media/journal/Vol_15_1_2007_1.pdf. Acesso em: 27 jun. 2021.

WILDNER, Priscila Paola. **Efeito das dietas AIN-93M e AIN-93M com modificações na fonte proteica sobre parâmetros hepáticos e sanguíneos em ratos Wistar**. 2017. Dissertação (Mestrado em Nutrição) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Florianópolis, 2017. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/188977>. Acesso em: 17 jun. 2022.

XU, X., et. al. The Chemical Composition of Brazilian Green Propolis and Its Protective Effects on Mouse Aortic Endothelial Cells against Inflammatory Injury. **Molecules**, v. 25, n. 20, 4612. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7587206/>. Acesso em: 16 jun. 2022.

ZAIA, Dimas A. M., ZAIA, Cássia Thaís B. V. e LICHTIG, Jaim. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, v. 21, n. 6, pp. 787-793, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40421998000600020>.

ANEXO C - CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)



Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da nanoemulsão de extrato aquoso da própolis verde na modulação da resposta imunológica em camundongos submetidos a uma dieta hipoproteica", protocolada sob o CEUA nº 3496020821 (ID 000647), sob a responsabilidade de **Sandra Aparecida Lima de Moura** e equipe; *Ana Carolina Lima; Jorge Andrés García Suárez; André Luciano Lopes* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Ouro Preto (CEUA/UFOP) na reunião de 06/10/2021.

We certify that the proposal "Evaluation of the green propolis aqueous extract nanoemulsion in the modulation of the immune response in mice fed a low-protein diet", utilizing 64 Heterogenics mice (64 females), protocol number CEUA 3496020821 (ID 000647), under the responsibility of **Sandra Aparecida Lima de Moura** and team; *Ana Carolina Lima; Jorge Andrés García Suárez; André Luciano Lopes* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Ouro Preto Federal University (CEUA/UFOP) in the meeting of 10/06/2021.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de 09/2021 a 08/2022

Área: Ciências Biológicas

Origem: Biotério de Experimentação do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Espécie: Camundongos heterogênicos

sexo: Fêmeas

idade: 6 a 6 semanas

N: 64

Linhagem: Swiss

Peso: 30 a 45 g

Local do experimento: Centro de Ciência Animal - CCA.

Ouro Preto, 27 de fevereiro de 2022

Profa. Dra. Paula Melo de Abreu Vieira
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Ouro Preto

Prof. Dr. Leonardo Máximo Cardoso
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Ouro Preto

ANEXO D - INGREDIENTES RECEITA AIN93 PARA ROEDORES COMERCIALIZADA PELA PRAGSOLUÇÕES



Quantidades produzidas de cada substância na fórmula

Pedido
 Cliente Ana Carolina Lima UFOP
 Data 22/09/21
 Validade 21/03/22 Manter congelado após retirar da caixa.
 Manipulador
 Formula Dieta AIN 93 M - Mod 3% de Proteina (COD 132)
 Dose (g ou ml) 7.200 Vezes: 1 X
 Dose (Kg ou L) 7,20

Cc	Produto	Quantidade prescrita	Fonecedor	Fator correção	Lote	Validade	Quantidade prod. (g/ml)	Pesados prod. (g/ml) qsp
	AMIDO DE MILHO	57,04000%	Ingredion	1	1800132	21/04/23	4.106,88	4.106,88
	CASEINA	3,53000%	AL	1	49166	11/08/22	254,160	254,160
	AMIDO DEXTRINIZADO	15,50000%	Indemil	1	AJ1331	13/10/22	1.116,000	1.116,000
	SACAROSE	10,00000%	GA	1	210611	11/06/23	720,000	720,000
	OLEO DE SOJA	4,00000%	LDC	1	403	24/01/22	288,000	288,000
	CELULOSE MICROCRISTALINA	5,00000%	Inlab	1	858073	31/12/22	360,000	360,000
	MIX MINERAL AIN 93 M	3,50000%	PragSoluções	1	90921	09/09/2022	252,000	252,000
	MIX VIT AIN 93	1,00000%	PragSoluções	1	060821	06/08/22	72,000	72,000
	L CISTINA	0,1800%	Inlab	1	854895	30/07/2024	12,960	12,960
	BITARTARATO DE COLINA	0,2500%	Inlab	1	853567	30/03/22	18,000	18,000
	BHA	0,0008%	Oficinallis	1	299548	21/10/21	0,058	0,058
		100,00080%					7.200	7.200

Corante marrom na água

Produto destinado a pesquisa. Isento de registro no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento.

Produzido de acordo com as Boas Práticas de Fabricação para a Indústria de Alimentação Animal. Instrução Normativa 4 - MAPA, 23/02/2007.

Embalagens:

Saco		Caixa	
Quant.	KG	Quant.	KG
2	3,5	1	5

Proposta: 04233-21

Pagamento: Ordem de fornecimento 16351-21

Nota fiscal: Ordem de fornecimento 16351-21

Informações complementares: Ordem de fornecimento 16351-21

O endereço para entrega é: Ordem de fornecimento 16351-21

Cuidado na secagem

Fazer xarope