



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

CAMILA DE BARROS PRADO MOURA SALES

**TOXICIDADE E EFEITO TERAPÊUTICO DO EXTRATO ETANÓLICO DA PRÓPOLIS
VERMELHA DE ALAGOAS EM INDIVÍDUOS COM OSTEOARTROSE DE JOELHO**

Maceió – AL

2020

CAMILA DE BARROS PRADO MOURA SALES

**TOXICIDADE E EFEITO TERAPÊUTICO DO EXTRATO ETANÓLICO DA PRÓPOLIS
VERMELHA DE ALAGOAS EM INDIVDUOS COM OSTEOARTROSE DE JOELHO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Alagoas, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Magna Suzana Alexandre-Moreira

Colaboradora: Profa. Dra. Flávia de Barros Prado Moura

Maceió - AL

2020

Catlogação na Fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

S163t Sales, Camila de Barros Prado Moura.
Toxicidade e efeito terapêutico de estrato etanólico da própolis vermelha de Alagoas em indivíduos com osteoartrose de joelho / Camila de Barros Prado Moura. – 2020.
107 f. : il., grafcs., tabs. color.

Orientadora: Magna Suzana Alexandre-Moreira.
Co-orientadora: Flávia de Barros Prado Moura.
Tese (doutorado em ciências da saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Maceió.

Bibliografia: f. 86-100.

Apêndices: f. 101-107.

1. Própole. 2. Osteoartrite. 3. Inflamação. 4. Testes de toxicidade. I. Título.

CDU: 616.728.3:638.135

Folha de Aprovação

Camila de Barros Prado Moura Sales

Toxicidade e efeito terapêutico da Própolis vermelha de Alagoas em indivíduos com osteoartrose de Joelho

Tese submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 25 de março de 2020.

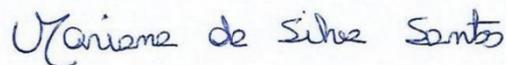
Banca Examinadora



Profa. Dra. Aline Cavalcanti Queiroz – (UFAL)



Profa. Dra. Ana Carolina Santana Vieira - (UFAL)



Mariana da Silva Santos – (CESMAC)

**Ao meu filho, pois ele foi e continuará sendo aquele que mais teve influência nesta
construção.**

Dedico

AGRADECIMENTOS

Os anos de um curso de Doutorado, nos ensinam a colaborar, ninguém faz ciência sem colaborações e construções coletivas, aos colaboradores, meu agradecimento. Aqui agradeço individualmente:

Aos meus pais, pelos privilégios ofertados, pela confiança, pelo apoio, por me levarem pelas mãos, braços e pernas até esse momento;

Ao meu filho Arthur por toda a compreensão dos momentos de ausência, por ser o motivo da minha conquista e por me inspirar a sempre ser melhor e ao meu marido, por me entender e apoiar nos momentos difíceis, por saber manter a calma nas tempestades e por estar comigo nos momentos de conquista;

Aos meus irmãos, pelo carinho, incentivo e amor, cada um de vocês me deu energia para continuar, com palavras ou atitudes;

A minha orientadora, professora Dra. Magna Suzana Alexandre-Moreira, pela compreensão e apoio durante os difíceis momentos, pelo incentivo e acreditar em mim e, acima de tudo, pelos ensinamentos repassados;

A minha coorientadora, professora Dra. Flávia de Barros Prado Moura, pelo incentivo na caminhada, pela dedicação carinhosa e por cada palavra de apoio;

Aos integrantes do Laboratório de Biologia e Desenvolvimento de Drosophila, em especial ao Professor Dr. Lucas Anhenzini, pela parceria firmada e pelo aprendizado compartilhado

Aos professores do programa de pós-graduação em Ciências da Saúde, pelos ensinamentos repassados;

Aos membros da minha banca de qualificação, professor Dr. Anderson Brandão, Professora Dra. Yolanda Cupertino e professora Dra. Aline Queiroz pela valorosa contribuição;

Aos membros da minha banca de defesa, professora Dra. Aline Queiroz, e professora Dra. Ana Carolina Vieira e Professora Dra. Mariana Santos, por aceitarem o convite para contribuir com esse processo;

Aos secretários do programa de pós-graduação em ciências da saúde, Jonathan e Juliene, pela paciência e empenho em dar resolutividade as solicitações;

Aos colegas, Fábio Pacheco, Anderson Brandão, Francisco Lins e Alyne Lima, pela especial e valorosa contribuição e pelo auxílio durante todo o curso deste trabalho;

Aos integrantes do Laboratório de Farmacologia e Imunidade – LAFI e orientandos da professora Magna, em especial aos queridos Mariana, Max, Flávio, Diogo, Tiago, Marcio, Shakira e Izabelly por todo o apoio prestado desde o início desta jornada e por ajudarem nos momentos urgentes;

Aos meus amigos, por torcerem por mim e por estarem próximos em todos os momentos;

As minhas cunhadas, Malena e Natalia, e ao meu cunhado Lindemberg, pela torcida e apoio prestados e aos meus lindos sobrinhos pelo simples fato de existirem em minha vida;

Aos funcionários da UFAL, que contribuíram para a realização deste trabalho;

Aos colegas de pós graduação, profissionais empenhados que compartilharam saberes, angústias, disciplinas, eventos e reuniões, que se apoiaram mutuamente e me ajudaram a aprimorar o pensamento científico, reflexivo e crítico;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) e à Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Alagoas (FAPEAL) pelo apoio financeiro e pela concessão da bolsa.

Muito obrigada!

Saber cada dia um pouco mais e usá-lo todos os dias para o bem

Jigoro Kano

RESUMO

A busca por produtos naturais que apresentem efeito anti-inflamatório e baixa toxicidade é estimulada por várias organizações mundiais e pode ser uma alternativa para o tratamento de doenças inflamatórias. No Brasil, a política nacional de práticas integrativas e complementares fomenta o estudo e utilização de produtos como a própolis vermelha. Este estudo teve como objetivo avaliar a toxicidade do extrato etanólico da própolis vermelha (EEPV) em modelos animais e celulares, bem como o efeito terapêutico em pacientes portadores de dores articulares decorrentes de osteoartrose (OA). A amostra de própolis foi coletada na cidade de Japaratinga, Alagoas, Brasil, sendo utilizado um extrato na concentração de 75 mg/mL para o ensaio clínico. Análise química foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas. A determinação da citotoxicidade foi realizada utilizando macrófagos da linhagem J774.A1 tratados com EEPV nas concentrações entre 0,1 e 100 mg/mL. Os ensaios para determinação da toxicidade com *Drosophila melanogaster* foram realizados após 1 e 7 dias de tratamento, e sobre o tempo de vida desses animais. Já o estudo com pacientes estudo clínico randomizado, duplo-cego, controlado por placebo, de fase 2 e 3, foi realizado durante 4 semanas, para validar a eficácia do EEPV na redução de dores articulares decorrente de osteoartrite e analisar a segurança do uso através das análises de marcadores de toxicidade hepática (AST e ALT) e renal (Ureia e Creatinina). A amostra da pesquisa foi composta de 83 indivíduos randomizados em 4 grupos, sendo os grupos 1 e 2 formados por indivíduos sem diagnóstico de osteoartrose que receberam EEPV (n=12) ou placebo (n=13), respectivamente. Os outros 58 participantes possuíam diagnóstico de osteoartrose e foram divididos em dois grupos sendo 30 indivíduos no grupo 3 e 28 no grupo 4 sendo que ao grupo 1 foi ofertado o EEPV e ao grupo 2 foi ofertada a solução placebo. Um total de 17 participantes dos grupos 3 (n=10) e 4 (n=7) tiveram amostra de sangue coletada para análise dos marcadores de toxicidade hepática e renal, após 12h de jejum. A avaliação clínica e funcional avaliou a intensidade da dor pela escala visual numérica da dor, amplitude de movimento, goniometria, força muscular, com o teste de força muscular manual e avaliação do nível de comprometimento funcional, utilizando o questionário funcional de Lequesne. A análise química da própolis vermelha evidenciou 60 compostos, dentre elas, algumas inéditas nas amostras de própolis de Alagoas já estudadas. Apenas as concentrações de 50 µg/mL e 100 µg/mL foram consideradas citotóxicas. Não evidenciamos toxicidade aguda e crônica em *Drosophila melanogaster* apesar do discreto aumento da taxa de mortalidade após exposição ao EEPV a 20%. A análise da toxicidade hepática e renal evidenciou que em indivíduos com ou sem OA, houve pequena variação nos níveis séricos das enzimas hepáticas, mantendo-se dentro dos valores de referência e sem diferença estatisticamente significativa. O mesmo comportamento foi evidenciado nos marcadores de toxicidade renal. Nossos dados não mostram melhora da força muscular, após 28 dias de utilização da própolis, porém com melhora significativa da amplitude de movimento da articulação do joelho. Ao final do acompanhamento o grupo EEPV apresentou redução significativa da dor ($p < 0,0001$), havendo diferença significativa na intensidade da dor entre os dois grupos ($p < 0,0005$), bem como melhora significativa no questionário funcional de Lequesne com diminuição de 14 pontos para 9,5 pontos no questionário do grupo em uso de EEPV. Por fim, não foram relatados efeitos secundários ou adversos. Concluímos que existe uma

possível origem botânica complementar na própolis utilizada, com baixa toxicidade *in vitro* e *in vivo*. Sendo possível perceber a eficácia terapêutica na melhora da dor, amplitude de movimento e funcionalidade de indivíduos portadores e OA de Joelho.

Palavras-chave: Própolis. *Drosophila melanogaster*. Testes de toxicidade. Osteoartrose. Inflamação.

ABSTRACT

The search for natural products that have an anti-inflammatory effect and low toxicity is stimulated by several organizations worldwide and may be an alternative for the treatment of inflammatory diseases. In Brazil, the national policy of integrative and complementary practices encourages the study and use of products such as red propolis. This study aimed to evaluate the toxicity of the ethanol extract of red propolis (EEPV) in animal and cellular models, as well as the therapeutic effect in patients with joint pain due to osteoarthritis (OA). The propolis sample was collected in the city of Japaratinga, Alagoas, Brazil, using an extract at a concentration of 75 mg / mL for the clinical trial. Chemical analysis was performed by high performance liquid chromatography coupled to the mass spectrometer. The determination of cytotoxicity was performed using macrophages of the J774.A1 strain treated with EEPV in concentrations between 0.1 and 100 mg / mL. The tests to determine toxicity with *Drosophila melanogaster* were performed after 1 and 7 days of treatment, and on the life span of these animals. The study with patients, a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical study, phase 2 and 3, was carried out for 4 weeks, to validate the effectiveness of EEPV in reducing joint pain due to osteoarthritis and to analyze the safety of use through analysis of hepatic (AST and ALT) and renal (Urea and Creatinine) toxicity markers. The research sample consisted of 83 individuals randomized into 4 groups, with groups 1 and 2 consisting of individuals without a diagnosis of osteoarthritis who received EEPV (n = 12) or placebo (n = 13), respectively. The other 58 participants had a diagnosis of osteoarthritis and were divided into two groups, 30 individuals in group 3 and 28 in group 4, while group 1 was offered EEPV and group 2 was offered a placebo solution. A total of 17 participants from groups 3 (n = 10) and 4 (n = 7) had a blood sample collected for analysis of liver and renal toxicity markers, after 12 hours of fasting. The clinical and functional evaluation evaluated the pain intensity by visual numerical scale of pain, range of motion, goniometry, muscle strength, with the manual muscle strength test and assessment of the level of functional impairment, using the Lequesne functional questionnaire. The chemical analysis of red propolis showed 60 compounds, among them, some new in the propolis samples of Alagoas already studied. Only concentrations of 50 µg / mL and 100 µg / mL were considered cytotoxic. We did not evidence acute or chronic toxicity in *Drosophila melanogaster* despite the slight increase in the mortality rate after exposure to 20% EEPV. The analysis of hepatic and renal toxicity showed that in individuals with or without OA, there was little variation in the serum levels of liver enzymes, remaining within the reference values and with no statistically significant difference. The same behavior was shown in the markers of renal toxicity. Our data show no improvement in muscle strength after 28 days of using propolis, but with a significant improvement in the range of motion of the knee joint. At the end of the follow-up, the EEPV group showed a significant reduction in pain ($p < 0.0001$), with a significant difference in pain intensity between the two groups ($p < 0.0005$), as well as a significant improvement in the Lequesne functional questionnaire with decrease from 14 points to 9.5 points in the questionnaire of the group using EEPV. Finally, no side or adverse effects were reported. We conclude that there is a possible complementary botanical origin in the propolis used, with low toxicity in vitro and in vivo. It is possible to perceive the therapeutic efficacy in improving pain, range of motion and functionality of individuals with knee OA.

Keywords: Propolis. Osteoarthritis. Inflammation. Toxicity tests.

Lista de figuras

| | | |
|-----------|--|----|
| Figura 1 | Composição da própolis..... | 22 |
| Figura 2 | Abelhas usam a própolis vermelha para fechar aberturas nas caixas apícolas..... | 23 |
| Figura 3 | Selo Denominação de Origem – Manguezais de Alagoas..... | 24 |
| Figura 4 | O processo inflamatório intra-articular na fisiopatologia da Osteoartrose..... | 34 |
| Figura 5 | Anatomia articular normal (A) e patológica (B)..... | 36 |
| Figura 6 | Diagrama alocação dos participantes..... | 48 |
| Figura 7 | Escala Numérica de Dor (A). Adaptações aceitas para pacientes com menor escolaridade – Associação entre as escalas analógica de dor, visual numérica de dor e escala de faces (B)..... | 52 |
| Figura 8 | Goniômetro Universal..... | 52 |
| Figura 9 | Cromatograma da Própolis Vermelha de Alagoas..... | 55 |
| Figura 10 | Efeito de EEPV na viabilidade de macrófagos J774A1. A citotoxicidade foi avaliada pelo ensaio MTT após 24 h de incubação de Células J774A.1 com 0,1 - 100 µg / mL de EEPV..... | 59 |
| Figura 11 | Avaliação da taxa de mortalidade aguda de indivíduos adultos machos (A) e fêmeas (B) de <i>Drosophila melanogaster</i> | 60 |
| Figura 12 | Avaliação da taxa de mortalidade crônica de indivíduos adultos machos (A) e fêmeas (B) de <i>Drosophila melanogaster</i> | 61 |
| Figura 13 | Avaliação do tempo de vida útil de indivíduos machos de <i>Drosophila melanogaster</i> expostos a diferentes concentrações de EEPV e etanol..... | 63 |
| Figura 14 | Avaliação do tempo de vida útil de indivíduos fêmeas de <i>Drosophila melanogaster</i> expostos a diferentes concentrações de EEPV e etanol..... | 64 |
| Figura 15 | Dosagens dos níveis séricos de AST, ALT, Ureia e Creatinina dos | |

| | | |
|-----------|--|----|
| | indivíduos sem diagnóstico clínico de Osteoartrose..... | 69 |
| Figura 16 | Dosagens dos níveis séricos de AST, ALT, Ureia e Creatinina dos indivíduos com diagnóstico clínico de Osteoartrose..... | 71 |
| Figura 17 | Comparação entre os níveis séricos de AST nos indivíduos com e sem osteoartrose que utilizaram própolis ou solução placebo..... | 72 |
| Figura 18 | Comparação entre os níveis séricos de ALT nos indivíduos com e sem osteoartrose que utilizaram própolis ou solução placebo..... | 73 |
| Figura 19 | Comparação entre os níveis séricos de Ureia nos indivíduos com e sem osteoartrose que utilizaram própolis ou solução placebo..... | 74 |
| Figura 20 | Comparação entre os níveis séricos de Creatinina nos indivíduos com e sem osteoartrose que utilizaram própolis ou solução placebo..... | 75 |
| Figura 21 | Avaliação da força muscular pela escala de Lovett..... | 77 |
| Figura 22 | Avaliação da amplitude de movimento técnica de goniometria | 78 |
| Figura 23 | Avaliação da intensidade da dor pela EVN..... | 79 |
| Figura 24 | Dor ao realizar o movimento de agachamento..... | 80 |
| Figura 25 | Melhora na função, evidenciada por redução dos escores do questionário funcional de Lequesne | 82 |

Lista de siglas e abreviaturas

| | |
|-----------------|---|
| aC | Antes de Cristo |
| ADAMT | Adrecanases |
| ADM | Amplitude de Movimento |
| AINE | Anti-inflamatório Não Esteroidal |
| ALT | Alanina Aminotransferase |
| ANOVA | Análise de Variância |
| AR | Artrite Reumatoide |
| AST | Aspartato Aminotransferase |
| ATP | Adenosina trifosfato |
| AVD | Atividade de Vida Diária |
| CO ₂ | Gás Carbônico |
| COX | Enzima Cicloxigenase |
| CR | Creatinina |
| CS | <i>Canton Special</i> |
| DAMP | Padrões Moleculares associados ao Dano |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| EAN | Escala de Avaliação Numérica |
| EEPV | Extrato Etanólico de Própolis Vermelha |
| HPLC | Cromatografia Líquida de alta Performance |
| HUPAA | Hospital Universitário Professor Alberto Antunes |
| IA | Intra-articular |
| ICBS | Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde |
| IL | Interleucina |
| IMC | Índice de Massa Corporal |
| INPI | Instituto Nacional de Propriedade Intelectual |
| LAFI | Laboratório de Farmacologia e Imunidade |
| MCA | Medicina complementar e Alternativa |
| MEC | Matriz Extra Celular |
| mg | Miligrama |
| mL | Mililitro |
| MMP | Metaloproteinases |
| NFG | <i>Nerve growth factor</i> , do inglês: Fator de crescimento do Nervo |

| | |
|-----------|---|
| NF-kB | Nuclear factor kappa B, do inglês: fator nuclear kappa B |
| OA | Osteoartrose |
| OARSI | Sociedade Internacional de Pesquisa em Osteoartrose |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| PRR | Receptores de Reconhecimento de Padrão |
| RING test | Teste de Geotaxia Rápida e Interativa |
| RPOA | Rápida Progressão da Osteoartrose |
| SOD | Superóxido Dismutase |
| SUS | Sistema Único de Saúde |
| SYSADOA | Medicamento de ação lenta para Osteoartrose |
| TCLE | Termo de Consentimento Livre e Esclarecido |
| TGF | <i>Transforming Growth Factor</i> , do inglês: Fator de Crescimento transformador |
| TNF | <i>Tumor necrosis fator</i> , do inglês: Fator de necrose tumoral |
| TPM | Tensão Pré-Menstrual |
| UFAL | Universidade Federal de Alagoas |
| UR | Ureia |
| °C | Graus Celsius |
| % | Percentual |

Sumário

| | |
|---|----|
| 1. REVISÃO DE LITERATURA | 18 |
| 1.1 - Práticas complementares | 18 |
| 1.3 Pesquisa clínica e D. melanogaster como modelo alternativo ao uso de animais mamíferos | 25 |
| 1.4 - Osteoartrose | 31 |
| 1.4.1 - Terapias atuais para Osteoartrose | 36 |
| 2. OBJETIVOS | 42 |
| 2.1 - Objetivo geral | 42 |
| 2.2 - Objetivos específicos | 42 |
| 3. METODOLOGIA | 43 |
| 3.1 – Obtenção do EEPV | 43 |
| 3.2 - Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) | 43 |
| 3.3 - Manutenção de macrófagos: | 44 |
| 3.4 - Determinação da citotoxicidade para a célula hospedeira: | 44 |
| 3.5 – D. melanogaster | 45 |
| 3.6 - Padronização do meio experimental | 45 |
| 3.6.1 - Adição de ágar | 45 |
| 3.6.2 - Substâncias utilizadas | 45 |
| 3.7 – Toxicidade aguda e crônica | 45 |
| 3.8 -Tempo de vida útil | 46 |
| 3.9 - Ensaio clínico | 46 |
| 3.9.1 - Randomização e cegamento | 46 |
| 3.9.2 - Participantes e critérios de elegibilidade | 47 |
| 3.9.3 - Amostra | 47 |
| 3.9.4 - Coletas de sangue | 49 |
| 3.9.4.1 - Preparo dos pacientes | 49 |
| 3.9.4.2 - Coleta pelo método a vácuo | 49 |
| 3.9.4.3 - Análise de perfis bioquímicos | 50 |
| 3.9.5 - Avaliação clínica e funcional | 50 |
| 3.9.5.1 - Medida de presença e intensidade da dor | 51 |
| 3.9.5.2 - Amplitude de Movimento | 52 |
| 3.9.5.3 - Força Muscular | 53 |

| | |
|--|-----|
| 3.9.5.4 - Questionário Funcional | 54 |
| 3.10 - Análise estatística | 54 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 55 |
| 4.1 - Análise química da própolis vermelha | 55 |
| 4.2 - Citotoxicidade | 58 |
| 4.3 - Toxicidade aguda e crônica em D. melanogaster | 59 |
| 4.4 - Tempo de vida útil de D. melanogaster após exposição oral de EEPV | 62 |
| 4.5 - Pesquisa clínica | 65 |
| 4.6 - Caracterização da amostra | 66 |
| 4.7 Toxicidade hepática e renal | 67 |
| 4.8 - Força muscular | 77 |
| 4.9 - Aumento da amplitude de movimento. | 78 |
| 4.10 - Dor | 79 |
| 4.11 - Melhora da funcionalidade. | 82 |
| 4.12 - Efeitos adversos | 83 |
| 5. CONCLUSÃO | 84 |
| 6. REFERÊNCIAS | 85 |
| APÊNDICE A – FICHA DE IDENTIFICAÇÃO | 101 |
| APÊNDICE B – FICHA DE AVALIAÇÃO..... | 102 |
| APÊNDICE C – FICHA DE ACOMPANHAMENTO DIÁRIO..... | 103 |
| APÊNDICE D – QUESTIONÁRIO FUNCIONAL DE LEQUESNE | 104 |
| APÊNDICE E – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO. | 105 |

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 - Práticas complementares

A utilização da natureza para fins terapêuticos é tão antiga quanto a civilização humana e, por muito tempo, produtos derivados de plantas e animais foram fundamentais para a área da saúde. Historicamente, as plantas medicinais são importantes como fitoterápicos e na descoberta de novos fármacos, estando no reino vegetal a maior contribuição para descoberta de fármacos. Recentemente, o uso das terapias complementares e alternativas vem ganhando espaço no mundo. Este termo envolve métodos e técnicas que fogem da medicina convencional e seu pensamento biomédico e hospitalocêntrico (BODEKER; KRONENBERG, 2002).

Este campo envolve a utilização de recursos que estimulem promoção da saúde, prevenção e recuperação de agravos por meio de processos dinâmicos que vão desde o uso de tecnologias leves, como a escuta qualificada e acolhedora e desenvolvimento de vínculo terapêutico, até o uso de produtos naturais, num processo que a Organização Mundial da Saúde (OMS) define como medicina complementar e alternativa-MCA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA), 2007)

Quase 50% da população de países desenvolvidos usa alguma forma de MCA (BODEKER; KRONENBERG, 2002), chegando a 70% - 90% da população em países em desenvolvimento (ROBINSON; ZHANG, 2011). Estes altos índices de uso, vem sendo acompanhados por um aumento das pesquisas e criação de políticas públicas que estimulam o uso baseado em evidências científicas acerca dessas práticas (BODEKER; KRONENBERG, 2002).

Os principais fatores, citados na literatura, envolvidos na decisão dos indivíduos em usar práticas complementares envolvem a percepção de que estas práticas não apresentam riscos, o desejo em tentar todas as alternativas terapêuticas, a percepção do indivíduo acerca do autocuidado, a pressão das mídias e redes sociais, a expectativa de recuperação completa após uso continuado, a crença na diminuição da dor aguda, a falta de resolutividade de tratamentos convencionais e o menor custo dessas práticas (YANG; SIBBRITT; ADAMS, 2017).

No Brasil, em 2003, iniciou-se um processo para a construção da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde

(SUS) com intenção de atender as diretrizes das Conferências Nacionais de Saúde e as recomendações da OMS (BRASIL, 2015).

Através dessa política, a utilização de produtos de origem natural é fomentada no Sistema único de Saúde, visando a ampliação do acesso, fortalecimento da cultura popular e diminuição dos gastos com tratamentos farmacológicos crônicos e de alto custo (BRASIL, 2015). A última atualização desta política, realizada em 2018, incluiu 10 novas práticas, dentre as quais a chamada apiterapia (BRASIL, 2018).

De acordo com a portaria nº 702 de 21 de março de 2018, apiterapia consiste na utilização de produtos produzidos pelas abelhas, visando o auxílio no tratamento de condições de saúde, mas também visando a promoção da saúde e a prevenção de agravos (BRASIL., 2018)

A inclusão da apiterapia tem respaldo em vários estudos que apontam que vários produtos produzidos pelas abelhas são usados desde a antiguidade (CORNARA et al., 2017; KOCOT et al., 2018) até os dias atuais devido as suas propriedades nutricionais e farmacêuticas (CORNARA et al., 2017).

As abelhas são importantes para a manutenção da vida, cerca de 80% das polinizações ocorrem graças a estes insetos sociais. A atuação do homem contudo, vem alterando o mutualismo planta-polinizador através da redução do habitat e uso indiscriminado de agrotóxicos. Organizadas numa sociedade de castas, existem 3 tipos de membros no enxame, a abelha rainha, que coordena os demais membros através de seus feromônios e alimenta-se exclusivamente de geleia real, os zangões que possuem a única função de fecundar a rainha e as abelhas operarias que realizam todas as tarefas de manutenção da colmeia, incluindo a defesa e o forrageamento, responsável por obter resinas e pólen para produção dos diferentes produtos derivados das abelhas (CUNNINGHAM-MINNICK; PETERS; CRIST, 2020; WINSTON, 2003).

Além da importância ambiental, as abelhas apresentam importância social, nutricional e econômica devido a ampla utilização popular de seus produtos, sendo os mais conhecidos e estudados: cera, veneno, geleia real, mel, pólen e própolis, onde os três primeiros são sintetizados pelas abelhas e os outros 3 são derivados de plantas e modificados pelas abelhas (BANKOVA; POPOVA; TRUSHEVA, 2018).

A cera é um produto bastante usado na indústria alimentícia e na fabricação de velas e cosméticos (CORNARA et al., 2017), enquanto o veneno, também

conhecido como apitoxina, tem relatos na literatura de atividade anticâncer, no alívio da dor e tratamento de parkinson (CORNARA et al., 2017).

Um produto bastante conhecido é a geleia real, um produto da secreção glandular das abelhas operárias que é usada para alimentar a abelha rainha durante toda a vida, bem como as larvas jovens durante sua maturação. Na literatura encontram-se descrições de suas propriedades neuroprotetora (MORITA et al., 2012) antibacteriana, antialérgica, anti-inflamatória, imunomoduladora (PASUPULETI et al., 2017), e seu uso para diminuição dos sintomas da tensão pré menstrual (TPM) (TAAVONI et al., 2014). Outro produto, usado na medicina complementar, é o pólen, com relatos na literatura de uso no tratamento de úlceras estomacais e doenças infecciosas. Uma revisão apontou inúmeras propriedades dentre as quais antidiabética e anti-aterosclerótica (CORNARA et al., 2017).

Dentre os produtos produzidos pela abelha, o mel é o mais conhecido, por suas propriedades nutricionais. Seu uso é reportado por antigos romanos, gregos e egípcios pelas suas propriedades nutricionais e biológicas (PASUPULETI et al., 2017). O mel também é um remédio caseiro, usado na medicina popular, que foi introduzido na prática clínica e farmacêutica (MOLAN, 1999). Atualmente uma série de propriedades são citadas na literatura que vão desde atividade antibacteriana (BRUDZYNSKI; SJAARDA, 2015) a antidiabética (EREJUWA; SULAIMAN; AB WAHAB, 2012). Uma recente revisão apontou o uso de mel no tratamento de feridas, tratamento de ulcera do pé diabético, desordens gástricas, propriedades antibacterianas e contra enteropatógenos (ADEBOLU, 2005), faringite e tosse, sendo esse um dos usos mais conhecidos do mel, chegando a ter efeito superior a fármacos tradicionais no tratamento de tosse induzida por infecções respiratórias superiores (SHADKAM; MOZAFFARI-KHOSRAVI; MOZAYAN, 2010), e como agente antioxidante e anti-inflamatório (PASUPULETI et al., 2017).

Na medicina complementar o pólen é usado para tratar úlceras estomacais e doenças infecciosas. Uma revisão apontou inúmeras propriedades dentre as quais antidiabética e anti-aterosclerótica (CORNARA et al., 2017).

1.2 - Própolis

De todos os produtos derivados da abelha, a própolis tem sido o mais estudado e apreciado na medicina, e foi objeto de estudo deste trabalho e caberá uma seção a parte.

O uso da própolis é descrito desde os tempos mais remotos. Há relatos de que 300 anos a.C. já se usava esse produto como composto na medicina popular (GHISALBERTI, 1979). O primeiro relato científico sobre a própolis e suas atividades foi publicado em 1908 (ANJUM et al., 2019). Pesquisadores afirmam que as propriedades medicinais da própolis foram identificadas por médicos gregos e romanos e por cientistas como Galeno e Aristóteles (CASTALDO; CAPASSO, 2002). Os antigos egípcios usavam a própolis para embalsamar seus mortos e para cuidar de feridas (CASTALDO; CAPASSO, 2002), mais recentemente a própolis foi usada durante guerras para curar feridas e regeneração tecidual. Durante a segunda Guerra Mundial há relatos de uso como anti-inflamatório (GHISALBERTI, 1979).

A própolis tem sido utilizada mundialmente na medicina popular e, atualmente, é comercializada como produto farmacêutico (RUFATTO et al., 2018). Seu uso foi descrito para diversas finalidades (PASUPULETI et al., 2017). Na literatura é possível encontrar referência de seu uso para distúrbios gastrointestinais, por ser eficaz contra *Giardia lamblia* e *Helicobacter pylori*, para cuidados ginecológicos, saúde oral, na redução de periodontite e gengivite, além de tratamento oncológico e em cuidados dermatológicos (PASUPULETI et al., 2017).

Própolis é um produto de características resinosas e composição variável, coletado a partir de várias espécies vegetais e que sofre adição de secreção das abelhas, sendo classificado como opoterápico (ANVISA, 2010). Ao contrário do que ocorre com o mel e a geleia real, as abelhas não utilizam a própolis como alimento, e sim como item de proteção estrutural, vedando orifícios e rachaduras da colmeia, funcionando como termorregulador, mantendo a temperatura interna da colmeia em cerca de 35°C, para evitar intempéries e proteção contra invasores, sendo também utilizada para mumificar invasores grandes que não podem ser retirados da colmeia e evitando a contaminação (SIMONE-FINSTROM; SPIVAK, 2010).

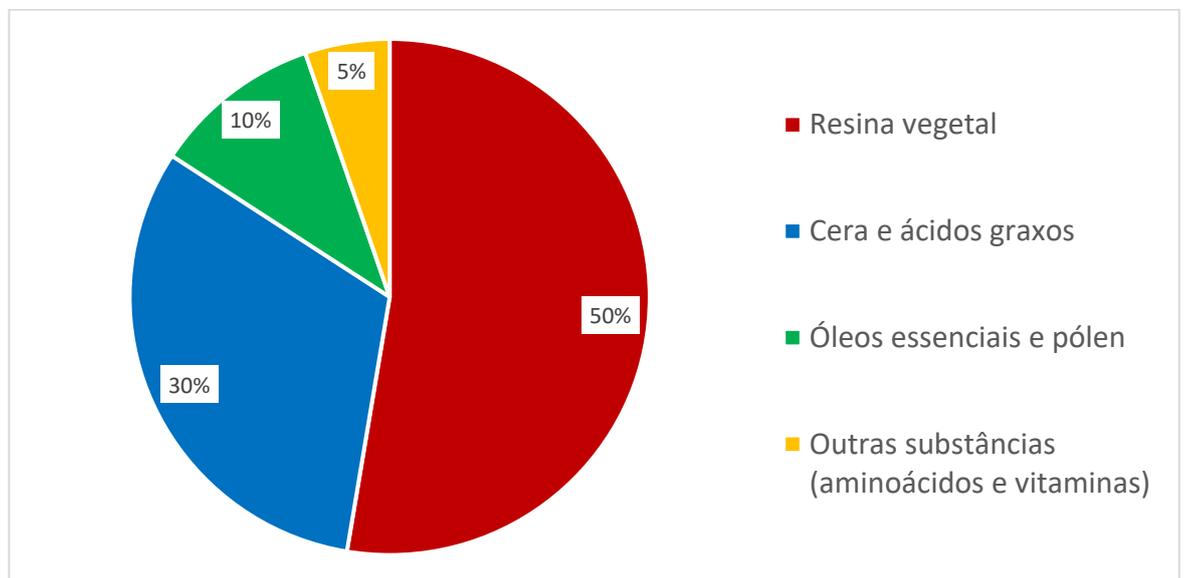
A própolis é, de forma genérica, conhecida como 'cola da abelha' devido ao seu uso interno na colmeia. O termo advém do grego 'pro', que significa defesa e 'polis' que pode ser atribuído a comunidade (BANKOVA; POPOVA; TRUSHEVA, 2018; KOCOT et al., 2018; PASUPULETI et al., 2017; SFORCIN, 2016). Nas

colmeias esta resina também protege larvas e estoque de mel contra infecções microbianas (RUFATTO et al., 2018; SFORCIN, 2016).

Para produção da própolis, as abelhas (*Apis mellifera* L.) coletam a resina das rachaduras na casca de árvores e brotos de folhas, podendo também coletar resina secretada naturalmente pelas plantas (BANKOVA; POPOVA; TRUSHEVA, 2018). Após a extração, as abelhas envolvem a resina nas patas traseiras e é então levada para a colmeia (DAUGSCH et al., 2008). Esta resina é mastigada, adicionadas enzimas salivares, como a beta-glicosidade (DE GROOT, 2013) e o material parcialmente digerido é misturado com cera de abelha (—MARCUCCI; DE CAMARGO; LOPES, 1996; GHISALBERTI, 1979).

Assim, é aceito que a própolis é composta em 50% por resinas e [bálsamos](#) vegetais; 30% de ceras e ácidos graxos, 10% de óleos essenciais e pólen e cerca de 5% de outras substâncias como aminoácidos e vitaminas (Figura 1) (BANKOVA; POPOVA; TRUSHEVA, 2018; KOCOT et al., 2018; PRZYBYŁEK; KARPIŃSKI, 2019).

Figura 1: Composição da própolis



Fonte: Autores, 2020

De forma geral, a própolis apresenta variação da cor de acordo com a origem botânica (ANJUM et al., 2019). Em baixas temperaturas, a própolis bruta apresenta consistência endurecida, se tornando maleável em temperatura ambiente e tendo seu ponto de derretimento entre 60-70°C (ANJUM et al., 2019).

Atualmente são descritos 13 tipos de própolis, que variam de acordo com a sua coloração, origem geográfica e fonte botânica. A própolis mais recentemente descrita foi a própolis Vermelha (Figura 2), o 13º tipo, que é encontrada no litoral nordestino, especialmente nos estados de Alagoas e Pernambuco (DAUGSCH et al., 2008).

Figura 2: Abelhas usam a própolis vermelha para fechar aberturas nas caixas apícolas.



Fonte: Autores, 2020

A própolis vermelha tem sido alvo de vários estudos desde a sua descrição, com presença de isoflavonoides, descritos como marcadores químicos deste tipo de própolis. Estudos apontam diferentes tipos de própolis vermelha (LÓPEZ et al., 2014), mas com características similares entre elas, tendo grande destaque para a própolis vermelha de Alagoas, que, em 2012, obteve o selo de indicação geográfica (Figura 3) pelo Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI) e é a única própolis vermelha com selo de denominação de origem no Brasil (INPI, 2000).

Figura 3: Selo Denominação de Origem – Manguezais de Alagoas



Fonte: INPI, 2000

Comercialmente é possível encontrar diversos produtos à base de própolis, como pastilhas, enxaguante bucal, cremes, gel, xarope para tosse, comprimido, capsula, loções, sprays, extratos e misturas antissépticas (ANJUM et al., 2019; FREIRES; DE ALENCAR; ROSALEN, 2016; SANTOS et al., 2019).

É possível afirmar que o etanol é o melhor solvente comercial, pois o extrato etanólico apresenta maior quantidade de flavonoides quando comparado ao extrato aquoso (PARK; IKEGAKI, 1998) e maior rendimento de diversos compostos fenólicos (CUNHA et al., 2004), que são associados ao potencial biológico da própolis (DEVEQUI-NUNES et al., 2018). O extrato etanólico também foi mais eficaz na diminuição de espécies reativas de oxigênio intracelular e intramitocondrial em comparação com extrato aquoso e com extrato aquoso de polietilenoglicol (KUBILIENE et al., 2018).

O uso da própolis em geral na saúde humana já é amplamente descrito. Dentre as propriedades citadas mais comumente na literatura, destacam-se a atividade antibacteriana, antitumoral, cicatrizante, antioxidante, imunomoduladora e anti-inflamatória (CORNARA et al., 2017; FREIRES; DE ALENCAR; ROSALEN, 2016; PASUPULETI et al., 2017; SANTOS et al., 2019).

Todas essas propriedades advêm dos mais de 300 compostos que já foram identificados nos 13 tipos de própolis descritos (ANJUM et al., 2019). Aceita-se que em geral, os diferentes tipos de própolis são ricos em flavonoides e cetonas. Tem sido aceito na literatura que em vez de um componente individual, parece haver uma

ação combinada dos diferentes complexos constituintes da própolis nas suas diversas atividades biológicas (ANJUM et al., 2019).

Os produtos naturais, geralmente são formados por vários compostos que acabam interferindo e alterando sua farmacocinética, de acordo com sua composição. A própolis, embora possua dezenas de compostos químicos, possui flavonoides como seus principais compostos. É geralmente aceito que os flavonoides da própolis têm absorção intestinal (MARCUCCI et al., 2001) e são transportados para o fígado por ligação à albumina. Autores apontam que própolis é eliminada pelos rins (NIJVELDT et al., 2001; SUN et al., 2000).

Apesar da grande variedade de constituintes químicos, não parece haver alterações farmacocinéticas quando a própolis é utilizada junto com alimentos (BURDOCK, 1998), essa hipótese é reforçada pela presença de flavonoides em vários componentes da dieta humana normal (NIJVELDT et al., 2001). Estudos também apontam que a própolis não altera clinicamente o efeito de vários medicamentos (CUSINATO et al., 2019).

Entre os desafios para a utilização e regulamentação da própolis e outros produtos naturais, a literatura cita a dificuldade de padronização destes produtos, a alocação inadequada de recursos para o desenvolvimento e capacitação em MCA e falta de uma metodologia padronizada para avaliação de segurança de uso, como testes de toxicidade. Outro ponto é a falta de evidências científicas de qualidade sobre o uso de algumas MCA em humanos. Para isso o desenvolvimento de pesquisas clínicas é essencial e justifica-se pelo uso histórico de alguns produtos. Alguns autores consideram que avançar de pesquisas em animais, direto para ensaios clínicos de avaliação de efeito é ético e necessário para o urgente embasamento do uso popular destes produtos (BODEKER; KRONENBERG, 2002).

1.3 Pesquisa clínica e *D. melanogaster* como modelo alternativo ao uso de animais mamíferos

As pesquisas realizadas com humanos, possuem, de forma geral, quatro fases de desenvolvimento, respeitando preceitos éticos e metodológicos. Os ensaios ditos de fase 1 possuem um pequeno número de participantes saudáveis e objetiva avaliar a segurança de um produto nesta população, podendo ter uma ou mais doses sendo testadas simultaneamente. Os estudos clínicos de fase 2, usualmente

apresentam uma curta duração e visam avaliar a eficácia e os efeitos adversos em indivíduos portadores de uma patologia ou condição de saúde específica. Ensaios de fase 3 devem ser randomizados e duplo cegos, sendo geralmente multicêntricos. Nesta fase o objetivo é analisar a eficácia e segurança do produto em relação a um placebo ou fármaco padrão já comercializado. A última fase, fase 4, consiste em ensaios em longo prazo, que vão avaliar os riscos e benefícios após o licenciamento do produto testado (SEDGWICK, 2014).

Apesar de bem descritas, essas fases podem estar sobrepostas na maioria dos estudos. Frequentemente os ensaios não se encaixam em apenas uma das fases, sendo aceito que os estudos sejam descritos em mais de uma fase (SEDGWICK, 2014)

No Brasil, para registro dos produtos opoterápicos, deve-se apresentar relatório técnico com informações sobre as características físico-químicas, teste de pureza, propriedades organolépticas, análise de marcadores e contaminantes, informações de segurança e eficácia, comprovadas por dados pré-clínicos e clínicos. Assim, apesar de própolis apresentar baixa toxicidade relatada, com dose de ausência de efeitos colaterais de 1,47 mg/kg/dia por 60 dias em ratos e camundongos (BURDOCK, 1998), sendo, em humanos, a dose tóxica acima de 15g/dia (CASTALDO; CAPASSO, 2002), esses dados referem-se a própolis em geral, não havendo dados disponíveis sobre toxicidade da própolis vermelha de Alagoas *in vivo*. Autores sugerem que os futuros estudos devem se concentrar na toxicidade aguda e crônica da própolis e seus compostos (FRANCHIN et al., 2018).

Outra exigência no que diz respeito ao estudo de novos fármacos e medicamentos é o estudo de sua toxicidade em humanos. Uma forma de avaliar ou inferir alguma toxicidade é por meio de análises de marcadores sanguíneos. A quantificação das concentrações séricas de enzimas, glicérides, compostos nitrogenados e demais componentes encontrados no plasma sanguíneo, com base em valores de referência pré-estabelecidos, possibilitam a avaliação e identificação de lesões, desordens e patologias em curso, tanto em um sistema específico quanto no organismo como um todo, também permitindo avaliar como o organismo se comporta frente a ingestão de uma substância exógena, bem como sua capacidade potencial de modular os diferentes parâmetros fisiológicos do organismo (OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, 2014)

O fígado é um órgão que tem papel essencial para o organismo, sendo responsável pela síntese, metabolismo e excreção de inúmeras substâncias e proteínas. As patologias de doenças hepáticas são notavelmente complexas, envolvendo formas agudas e crônicas de hepatite, cirrose, obstrução do ducto biliar, colestase e necrose das células hepáticas, entre outros distúrbios (CORRIGAN, M.; HIRSCHFIELD, 2015; RODWELL, V. W.; BENDER, D. A.; BOTHAM, K. M.; KENNELLY, P. J.; WEIL, 2017).

Para o diagnóstico de alterações hepáticas, além de outras avaliações clínicas, são comumente observadas as alterações nos níveis séricos de parâmetros bioquímicos sorológicos. Os níveis séricos das enzimas Aspartato Aminotransferase (AST) e Alanina Aminotransferase (ALT), quando elevados acima dos limites de referência são indicativos de lesão nos hepatócitos, células do sistema hepático, entretanto, ALT por ser uma enzima presente em maior quantidade nos hepatócitos do que em outros tecidos tem maior relevância clínica quando detectadas alterações em seus valores, mesmo em relação aos níveis de séricos AST (COMPRI-NARDY, M.; STELLA, M. B.; OLIVEIRA, 2015; LIMA, A. O.; SOARES, J. B.; GRECO, J. B.; GALIZZI, J.; CANÇADO, 2010).

Os rins têm muitas funções importantes tais como filtração e reabsorção, manutenção da homeostase e outras funções metabólicas, atuando de forma a evitar desequilíbrios fisiológicos, e conseqüentemente desencadear graves patologias. Avaliar a filtração renal dos compostos nitrogenados apresenta grande relevância clínica. Lesões na estrutura do tecido renal, sejam de caráter glomerular, tubular ou intersticial, causam elevações dos teores de ureia plasmática, condição denominada por hiperúremia, a hipourêmia por sua vez, é caracterizada por baixos níveis de ureia no sangue (BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, 2014; MOTTA, 2009).

Outro parâmetro bioquímico relevante para avaliação da função renal trata-se da Creatinina sérica (CR). Consistindo essencialmente num produto metabólico da creatina muscular, pela sua especificidade e sensibilidade, é um importante parâmetro usado na prática clínica para avaliação da taxa de filtração glomerular e reduções em sua velocidade, que são associadas a aumentos nos níveis séricos de creatinina e indicativos do grau de deterioração renal quando na presença de patologias nesse sistema (KOEPPEN, B. M.; STANTON, 2013; RODWELL, V. W.; BENDER, D. A.; BOTHAM, K. M.; KENNELLY, P. J.; WEIL, 2017).

A existência de diferentes modelos animais, permite uma ampla gama de testes e avaliações para diferentes situações experimentais, considerando que cada modelo possui uma especificidade e um protocolo de utilização (PANCHAL; TIWARI, 2017). Os principais modelos citados em diversos artigos nas ciências da saúde são os modelos roedores, como ratos e camundongos, importantes para o conhecimento de mecanismos de ação e comportamento, frente a diversos fármacos. Porém esses modelos não possibilitam investigações mais detalhadas sobre o efeito de determinadas substâncias em todas as etapas do seu desenvolvimento, por exemplo (KAUN; DEVINENI; HEBERLEIN, 2012). Esta dificuldade é facilmente entendida pela demanda de tempo e de custos para a manutenção, reprodução e cuidados com esses animais (KAUN; DEVINENI; HEBERLEIN, 2012).

Assim, outros modelos animais, mais acessíveis técnica e economicamente, tem seu uso popularizado ao longo dos anos, a exemplo da *Drosophila melanogaster*. Essa espécie permite investigar a resposta aguda a fármacos e compreender os mecanismos envolvidos. Ademais é possível avaliar todo o seu ciclo de vida e a influência de substâncias em suas diferentes fases de desenvolvimento (KAUN; DEVINENI; HEBERLEIN, 2012).

Autores também apontam a *Drosophila melanogaster* como uma boa espécie animal para ensaio de diferentes extratos dos diversos tipos de própolis já descritas, com diversos objetivos. Um estudo utilizou o fármaco donepezil associado a diferentes concentrações do extrato etanólico de própolis com intuito de avaliar o comportamento de memória desta espécie, observando que a associação pode promover uma melhor resposta na memória de curto e de longo prazo (AYIKOBUA et al., 2018). Outro grupo encontrou uma diminuição da mutação somática e da recombinação induzida pela doxorubicina (VALADARES; GRAF; SPANÓ, 2008).

A *Drosophila melanogaster* possui inúmeras vantagens quando comparamos com outras espécies animais. Existem relatos do uso de *D. melanogaster* como animal experimental, desde o início do século XX, sendo este um dos modelos mais popularmente usados na ciência moderna. As diversas vantagens da mosca da fruta, nome popular da *D. melanogaster*, são apresentadas na tabela 1.

Tabela 1 – Vantagens do uso da *D. melanogaster* como modelo experimental

| Característica | Descrição | Comentário | Referência |
|----------------|-----------|------------|------------|
|----------------|-----------|------------|------------|

| | | | |
|------------------------------|---|---|---|
| Tamanho | 3 milímetros (adulto) | Permite armazenamento e manuseio em espaços pequenos | (MARKOW; O'GRADY, 2006; PANCHAL; TIWARI, 2017) |
| Custo de manutenção | Baixo | Permite a manutenção de milhares de exemplares e diferentes genótipos | (KAUN; DEVINENI; HEBERLEIN, 2012; PANCHAL; TIWARI, 2017; PARVATHI; AMRITHA; PAUL, 2009) |
| Manuseio | Fácil | Ensaio básicos podem ser realizados mesmo com curto período de treinamento | (PANCHAL; TIWARI, 2017; PARVATHI; AMRITHA; PAUL, 2009) |
| Ciclo de vida | 10 a 12 dias a 25°C | Permite rápida manutenção e recuperação do biotério | (LINFORD et al., 2013) |
| Tempo de vida útil | 90 a 120 dias | Permite o acompanhamento de todas as etapas do desenvolvimento | (PANCHAL; TIWARI, 2017) |
| Fecundidade | Cerca de 40 ovos por dia | Fecundidade alta, permitindo manutenção do estoque e realização de avaliações de estágio embrionário e larval com grandes amostras | (MARKOW, 2015; PANCHAL; TIWARI, 2017) |
| Similaridade Genética | 75% de similaridad e, com humanos, em relação aos genes relacionado s a doenças | Torna este modelo uma excelente alternativa para ensaios <i>in vivo</i> , com foco principal na redução de danos aos demais modelos animais. | (KAUN; DEVINENI; HEBERLEIN, 2012; PANCHAL; TIWARI, 2017) |
| Ensaio com Drosophila | Diversos ensaios citados na literatura | Existem inumeros estudos que avaliam o potencial de produtos naturais em modelos de <i>Drosophila melanogaster</i> , tornando este um modelo confiável para a realização de diversos ensaios; | (DANILOV et al., 2015; JOVANOVIĆ et al., 2018; MCCLURE; FRENCH; HEBERLEIN, 2011; PANCHAL; TIWARI, 2017; STRECKER et al., 1995; WU et al., 2017) |
| Bando de Dados | FlyBase | Existência de um banco de dados <i>on-line</i> , permite a consulta a uma | (ALLOCCA; ZOLA; BELLOSTA, 2018; |

O ciclo de vida desta espécie sofre variações de acordo com a temperatura e a disponibilidade de nutrientes. Em temperatura de 25°C o tempo de desenvolvimento embrião-adulto é de cerca de 10 dias, sendo maior em temperaturas mais baixas, e em menor tempo quando em temperaturas maiores (LINFORD et al., 2013). Uma fêmea fértil é capaz de depositar dezenas de ovos e o período de embriogênese dura 24h, resultando em uma larva de primeiro instar (ASHBURNER, 2005).

Diversas revisões (PANCHAL; TIWARI, 2017) apontam os fatores que indicam a *D. melanogaster* como um positivo modelo experimental, com destaque para o curto ciclo de vida e tempo de vida útil, sendo possível avaliar todo o desenvolvimento desta espécie, pouco espaço necessário para manter uma grande quantidade de moscas em laboratório, alta taxa de fecundidade, sequenciamento completo do seu genoma, apresentar 75% de similaridade, com humanos, em relação aos genes relacionados a doenças e a possibilidade de utilização de indivíduos geneticamente modificados (KAUN; DEVINENI; HEBERLEIN, 2012; PANCHAL; TIWARI, 2017).

Diversos ensaios, com diferentes finalidades, podem ser realizados utilizando a *D. melanogaster* como modelo animal, dentre os mais citados tem-se os ensaios de avaliação das diferentes etapas de desenvolvimento, avaliação do tempo de vida útil, ensaios de comportamento e toxicidade (PANCHAL; TIWARI, 2017).

Os ensaios de sobrevivência são muito citados em diferentes artigos, podendo haver exposição de embriões (MCCLURE; FRENCH; HEBERLEIN, 2011), larvas (MCCLURE; FRENCH; HEBERLEIN, 2011), pupas (VAN DER LINDE et al., 2014) e adultos (SUH et al., 2017). Cada um desses ensaios possui objetivos e protocolos específicos que devem ser considerados de acordo com as necessidades de avaliação. Uma revisão aponta que a extensão na sobrevivência das moscas sugere um efeito positivo da substância testada, neste aspecto (PANCHAL; TIWARI, 2017).

Apesar dos resultados positivos e da ampla utilização da própolis vermelha de Alagoas, não foram encontrados estudos para avaliar a toxicidade deste extrato em *D. melanogaster*.

1.4 - Osteoartrose

A Osteoartrose (OA) é uma patologia progressiva caracterizada pela degeneração da cartilagem e alteração nos demais tecidos articulares, incluindo remodelamento do osso subcondral, surgimento de osteófitos, frouxidão ligamentar, fraqueza muscular, inflamação e fibrose da capsula articular (BRUYÈRE et al., 2019; DULAY; COOPER; DENNISON, 2015). Essas alterações levam a uma série de manifestações clínicas cujas mais importantes são dor articular, edema local e rigidez articular com consequente limitação de movimento (CLEVELAND et al., 2019; DULAY; COOPER; DENNISON, 2015).

Dentre as patologias articulares, a OA é a mais bem descrita na literatura (CLEVELAND et al., 2019), com relatos desde o século XVII, onde o termo gota era atribuído a todas as condições articulares (VAN DEN BOSCH, 2019). Desde então, vários relatos foram publicados e as doenças articulares passaram por mudanças nas suas nomenclaturas e classificações, sendo categorizadas e melhor descritas (DEQUEKER; LUYTEN, 2008). Assim, apenas em meados de 1850, o termo OA foi empregado com apresentação anatômica, patológica e aspectos que a diferenciavam da artrite reumatoide, como até então era classificada (VAN DEN BOSCH, 2019). Apesar da relativa recente descrição e caracterização enquanto patologia, a OA não é uma doença nova, havendo descrição de alterações compatíveis com a doença em esqueletos humanos pré-históricos (DEQUEKER; LUYTEN, 2008; WALLACE et al., 2017).

A OA é a forma mais comum de artrite, associada com morbidade, mortalidade, incapacidade física e maiores custos com saúde. O acometimento da articulação do joelho pela OA frequentemente ocasiona quadro de dor e inabilidade física com consequente redução da qualidade de vida (LANE; SHIDARA; WISE, 2017).

Dados epidemiológicos sobre OA relacionados ao Brasil ou América do Sul são escassos (CROSS et al., 2014). Uma revisão dos artigos publicados nos últimos 5 anos, não encontrou artigos com informações sobre a população sul-americana (HUNTER; BIERMA-ZEINSTRA, 2019), porém estima-se que nos países em desenvolvimento das Américas, a prevalência de OA em homens é de mais de 20%, enquanto para mulheres essa taxa sobe para mais de 30% (WOOLF; PFLEGER, 2003).

A prevalência global de OA de joelho é de aproximadamente 3,8%, com pico de prevalência aos 50 anos (CROSS et al., 2014). De acordo com a *Global Burden of Diseases*, cerca de 263 milhões de pessoas são portadores de osteoartrose de joelho no mundo, com mais de 12 milhões de novos casos diagnosticados em 2017 (VOS et al., 2017), ocupando o 11º lugar no ranking de incapacidade global (CROSS et al., 2014).

Em um estudo com mais de 2 mil cadáveres cujo objetivo foi analisar a prevalência de OA ao longo de diferentes épocas, desde a pré-história, passando pela era industrial até o que os autores chamam de era pós industrial, foi observado maior prevalência de OA na era pós industrial quando comparado aos outros dois períodos. Estes autores afirmam que até metade do século XX, a prevalência de OA de joelho aproximadamente dobrou (WALLACE et al., 2017), sendo hoje referenciada com a responsável por 85% das OA do mundo (HUNTER; BIERMA-ZEINSTRA, 2019).

Já existem evidências científicas para relacionar algumas atividades ocupacionais com o aumentado risco de desenvolvimento de OA. Foi encontrado que cerca de 5% das artroses de joelho são decorrentes de sobrecarga ocupacional, e aparentemente essa relação é verdadeira para homens e não para mulheres (DULAY; COOPER; DENNISON, 2015).

Há ainda, uma série de estudos que indicam que indivíduos que submeteram seus joelhos a agachamentos e cargas significativas e recorrentes tem mais probabilidade de desenvolver OA (COOPER et al., 1994), bem como a ocorrência de lesões meniscais e ligamentares são fortemente associadas ao risco alto de desenvolver artrose de joelho (COSTA-PAZ et al., 2019; MADALENO et al., 2018).

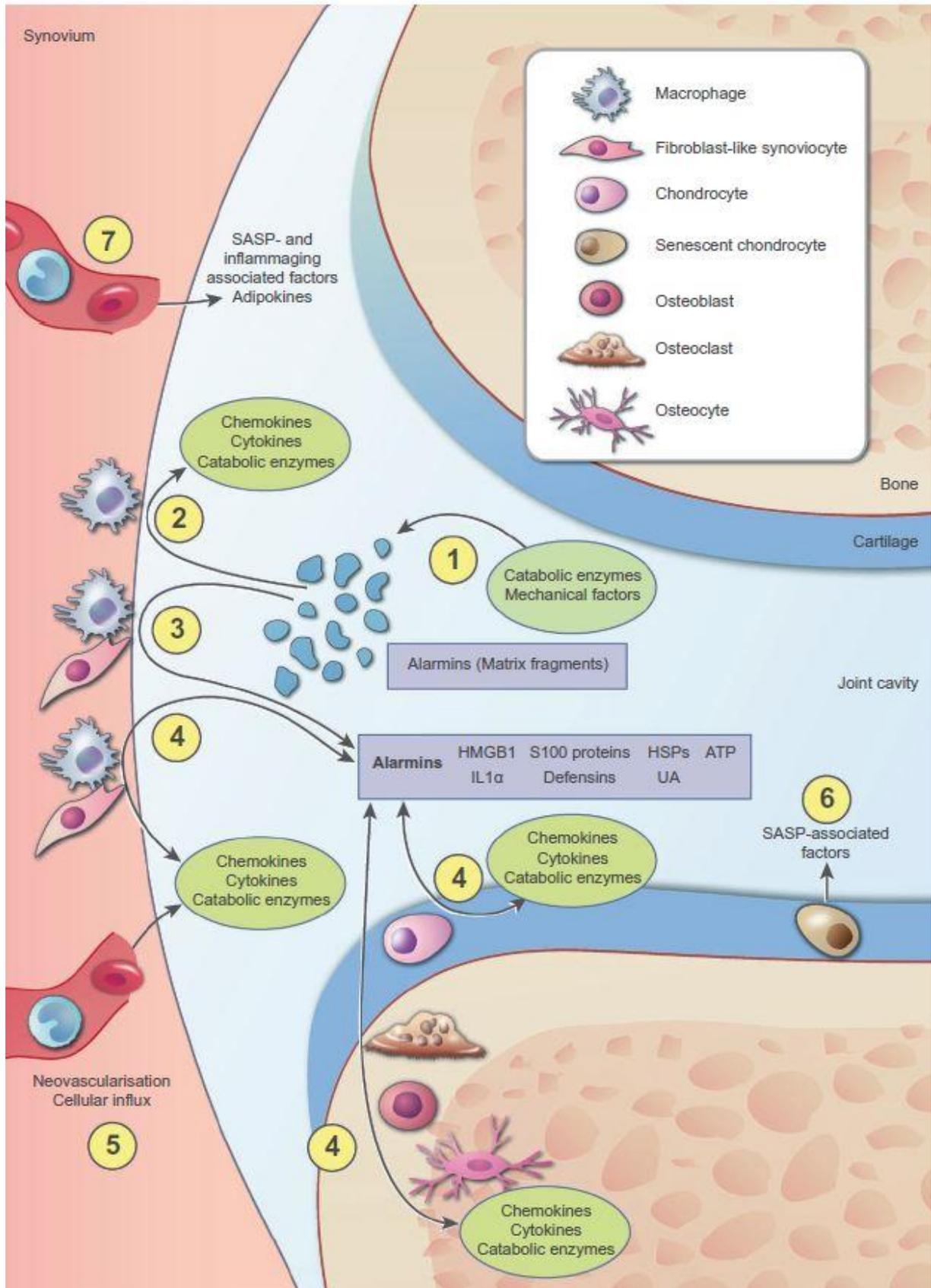
Outra correlação significativa já demonstrada foi entre OA e mortalidade por doença cardiovascular. Uma pesquisa com acompanhamento de 24 anos, avaliou o impacto da dor decorrente de OA de joelho na mortalidade. Este estudo incluiu mais de 4 mil indivíduos acima de 45 anos e encontrou que em indivíduos com OA a porcentagem de obesos e diabéticos aumenta com o tempo e que 37,2% das mortes ocorreram por doença cardiovascular (CLEVELAND et al., 2019). Esses achados corroboram dados de outros autores que sugerem que essa ocorrência pode estar relacionada à limitação de movimento decorrente do processo de desgaste articular (TURKIEWICZ; KIADALIRI; ENGLUND, 2019).

Apesar de ser uma patologia bastante estudada, a fisiopatologia da OA ainda apresenta questões sem investigação e que precisam ser mais amplamente explicadas. O que se aceita atualmente e vem sendo apresentado em grandes revisões sobre o tema é que o processo inflamatório é marcante e está presente como figura central na patogênese da doença (VAN DEN BOSCH, 2019). De forma oposta ao que ocorre na artrite reumatoide (AR), onde existe uma inflamação sinovial grave, com marcadores sistêmicos bem descritos, na OA o que se tem é uma inflamação crônica e de baixo grau, com a resposta do sistema imune inato fortemente associada ao processo inflamatório crônico (VAN DEN BOSCH, 2019).

Ainda não está totalmente esclarecido se esse processo inflamatório existe como causa ou consequência do dano articular e da degradação da matriz cartilaginosa. A teoria mais aceita e melhor explicada é a de que a inflamação ocorre em resposta a fragmentos de cartilagem liberados após trauma de maior ou menor porte na articulação (Figura 4) (HOMANDBERG; HUI, 1996; VAN DEN BOSCH, 2019). Essa ideia explica a associação positiva, já descrita, entre sobrecarga de trabalho e lesões ligamentares e uma maior ocorrência de OA de joelho (COSTA-PAZ et al., 2019; MADALENO et al., 2018).

Os fragmentos de matriz extra celular (MEC), como hialuronato de baixo peso molecular, fibronectina e tenascina, são reconhecidos como padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) que se ligam a receptores de reconhecimento padrão (PRRs) em células da imunidade inata presentes na articulação. Esses receptores, quando ativados, estimulam a produção de citocinas pró-inflamatórias como as interleucinas IL1, IL6, IL8 e fator de necrose tumoral (TNF) alfa, o que resulta em aumento da produção de enzimas que degradam a MEC, como as metaloproteinases (MMPs) e adrecanases (ADAMT) que estão envolvidas no dano a cartilagem articular, característico da OA (BARRETO et al., 2015; HWANG et al., 2015). A presença de cristais de ácido úrico na articulação de indivíduos com OA já foi demonstrada. Acredita-se que esses cristais podem, via ativação de inflamossomas, favorecer a liberação de IL 1 beta e IL 18 (DENOBLE et al., 2011).

Figura 4: O processo inflamatório intra-articular na fisiopatologia da Osteoartrose



Fonte: VAN DEN BOSCH, 2019. A teoria mais aceita é relacionada com a existência de fragmentos de matriz oriundos de traumas articulares de maior ou menor intensidade. Esses fragmentos (1) aumentam a inflamação sinovial através da estimulação de macrófagos residentes na capsula sinovial. Estas células sinoviais ativadas passam a produzir mediadores pró-inflamatórios (2). Há ainda o reconhecimento destes fragmentos como padrões associados ao não, estimulando a formação de outras substâncias pró inflamatórias e ativando enzimas metabólicas (3). Essas substâncias, a exemplo do ácido úrico, iniciam um feedback positivo em relação a produção de citocinas e quimiocinas e enzimas de degradação de matriz (4). Este processo inflamatório estimula a neovascularização e o influxo de células inflamatórias que também começam a produzir quimiocinas, citocinas e enzimas catabólicas (5). Além disso, a senescência celular está associada a um aumento na liberação de fatores, como muitas citocinas e enzimas catabólicas, denominadas fenótipo secretório associado a senescência (SASP), que estimula ainda mais o estado inflamatório da articulação (6 e 7).

Uma outra via inflamatória ocorre através da expressão, estimuladas por citocinas – principalmente IL1beta e TNF alfa, de beta defensina nos condrócitos, que além de aumentar MMPs, também atua diminuindo a produção de inibidores teciduais de MMP, gerando um desequilíbrio (VAROGA et al., 2005). Outro mecanismo de ativação da cascata inflamatória é o processo de senescência celular. De acordo com a literatura, com o envelhecimento, as células liberam mediadores pró-inflamatórios e catabólicos (Figura 4).(VAN DEN BOSCH, 2019).

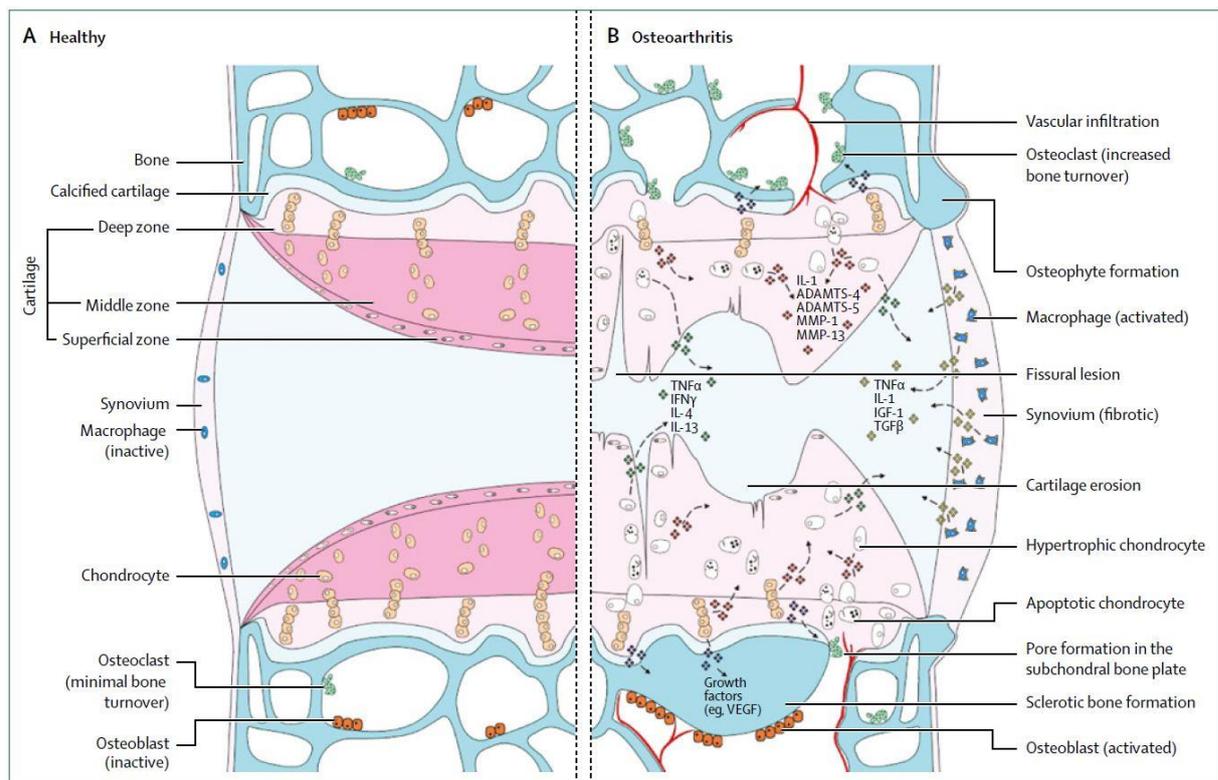
Todos esses processos levam ao estresse celular com consequente liberação de adenosina trifosfato (ATP). Estudos indicam que o ATP estimula a morte de condrócitos e a calcificação da cartilagem, tornando-a mais sujeita a rupturas superficiais e profundas gerando os danos articulares típicos da OA (RYAN et al., 1992). Em resposta a esses danos, os condrócitos, numa tentativa de reparação tecidual, aumentam a atividade de síntese e reparo e acabam por favorecer a produção de MMP e outros mediadores pró-inflamatórios, resultantes do metabolismo, o que desregula a função celular, aumentando a resposta inflamatória e proliferativa, com formação de novos vasos nas estruturas peri articulares e hipertrofia dos tecidos (VAN DEN BOSCH, 2019).

O osso subcondral também é afetado por esses processos, com desequilíbrio entre a síntese e a degradação óssea e culminando em remodelamento ósseo e formação de osteófitos, que também sofrem influência de sobrecargas mecânicas (figura 5) (HSIA et al., 2019; HUNTER; BIERMA-ZEINSTRA, 2019).

O aumento de estresse oxidativo celular no processo fisiopatológico da OA é bem documentado. Estudos referem que a enzima superóxido dismutase (SOD) está diminuída no início da patologia e com a progressão da destruição da MEC. Sabe-se

que com a diminuição desta enzima espécies reativas de oxigênio deixam de ser convertidas, o que leva a aumento do estresse oxidativo com consequente aumento do dano (AIGNER et al., 2006; REGAN et al., 2005). Esse conjunto de fatores inflamatórios e oxidativos favorecem a progressão da OA, sendo necessárias as pesquisas que busquem novas terapias que sejam capazes de romper com o ciclo de inflamação e dano característico deste acometimento articular.

Figura 5: Anatomia articular normal (A) e patológica (B)



Fonte: HUNTER; BIERMA-ZEINSTRA, 2019. A cronicidade do processo inflamatório leva a alterações e remodelamento de estruturas intra-articulares. As cartilagens intra-articulares tornam-se mais enrijecidas e susceptíveis a fissuras e erosões, diminuindo seu papel de absorção de impactos. Ocorre ainda uma permanente ativação dos macrófagos residentes e fibrose da capsula articular. O osso subcondral é também afetado com processo de esclerose e formação de osteófitos.

1.4.1 - Terapias atuais para Osteoartrose

Dada a complexidade fisiopatológica e a grande limitação física decorrente a OA, as principais associações de estudo da OA lançam periodicamente diretrizes para o tratamento desta alteração. Segundo as atuais diretrizes e revisões de literatura publicadas recentemente em revistas de alto impacto, o tratamento não

farmacológico, com educação em saúde, redução de peso e realização de exercícios orientados, deve ser a primeira linha de tratamento, associada as terapias farmacológicas, quando necessário (CROSS et al., 2014; HUNTER; BIERMAZEINSTRA, 2019).

Uma revisão que incluiu ensaios clínicos randomizados, controlados por placebo, com mais de 3500 participantes no total, investigou os benefícios e malefícios do paracetamol em relação ao placebo para osteoartrose de quadril e joelho, concluindo que o paracetamol fornece apenas melhorias mínimas na dor e na função de pessoas com osteoartrose de joelho e quadril, sem diferença dose-resposta (LEOPOLDINO et al., 2019). Esses dados foram reforçados por outros estudos que apontaram que o paracetamol foi fracamente recomendado para uso regular por apresentar vários efeitos colateral relatados com o uso a longo prazo (BRUYÈRE et al., 2019; MAJEED et al., 2018).

O uso de medicamentos sintomáticos de ação lenta para OA (SYSADOA), tiveram uso analisado de forma positiva pelas associações de estudos em reumatologia. Porém foram elencadas diversas dificuldades que vão desde a aquisição desses produtos, até as reais evidências de uso. Exemplos destes fármacos são a glucosamina e condroitina (BRUYÈRE et al., 2019).

Glucosamina e condroitina são compostos naturais do corpo, que são os principais substratos da biossíntese de proteoglicanos, componentes essenciais da manutenção da cartilagem articular. Algumas revisões sobre o uso da condroitina e glucosamina estão disponíveis, com conclusão de que a glucosamina é superior ao placebo em relação a dor e função, porém o mesmo não pode ser concluído em relação condroitina pela baixa qualidade dos ensaios (MANTOVANI; MACCARI; VOLPI, 2016; REGINSTER et al., 2012; ZHU et al., 2018).

Em contraponto, um importante ensaio clínico com mais de 500 participantes, não observou redução significativa da dor na associação de condroitina e glucosamina, quando comparado ao placebo. (FRANSEN et al., 2015). Esses dados corroboram uma revisão que recomendou o uso da condroitina, desde que usada em substituição a glucosamina, pois o uso dos dois fármacos associados não possui nível de evidência suficiente para sua recomendação (BRUYÈRE et al., 2019).

Dessa forma, as diretrizes ainda não são consensuais em relação à recomendação de glucosamina e condroitina, devido à heterogeneidade de resultados e a existência de viés de publicação (MAJEED et al., 2018; ZHU et al.,

2018). Assim a busca por terapias que diminuam sinais clínicos em curto prazo continua sendo essencial dado o alto grau de incapacidade (VOS et al., 2017) e diminuição de qualidade de vida desses indivíduos (VITALONI et al., 2019).

Anti-inflamatórios são usualmente utilizados por portadores de OA. Estudos apontam que os anti-inflamatórios não esteroidais (AINE) são seguros apenas para uso intermitente, devido aos seus efeitos colaterais e considerando o perfil de risco do paciente (BRUYÈRE et al., 2019; MAJEED et al., 2018). O uso de AINE tópico associado a SYSADOA é fortemente recomendado (BRUYÈRE et al., 2019). Um dos fármacos mais usados, devido ao seu baixo risco de efeitos adversos gastrointestinais é o celecoxib, porém este fármaco, por atuar inibindo seletivamente a enzima cicloxigenases tipo 2 (COX 2), apresenta-se com alto risco para ocorrência de eventos cardiovasculares. Seu uso foi considerado seguro, podendo ser usado em idosos, que comumente tem maior comprometimento gastrointestinal, e indivíduos sem histórico de doença cardiovascular existente (KRASSELT; BAERWALD, 2019).

Há ainda um grande uso de opioides por esses indivíduos. Um grupo analisou a dispensação de opioides para indivíduos com osteoartrose, e encontraram que pessoas com OA receberam cerca de duas vezes mais dispensação de opioides do que pessoas sem OA e 11% do total da dispensação de opioides foi para pessoas com OA, sendo a maioria para OA de joelho. Assim concluem que pessoas com OA tem um nível alarmante do uso de opioide, o que é controverso em relação as diretrizes atuais de tratamento, devido ao risco de dependência e efeitos colaterais (THORLUND et al., 2019). Os autores ainda afirmam que 25% do pacientes com OA receberam opioide em um período de 12 meses e isso é mais que o dobro da taxa da população sem OA (THORLUND et al., 2019). Assim, os autores relatam que o uso de opioides deve ser realizado apenas quando extremamente necessário, em pequenas doses e por um curto período (MAJEED et al., 2018).

Terapias intra-articulares (IA) foram fracamente recomendadas, seja para utilização de ácido hialurônico, ou para corticosteroides (BRUYÈRE et al., 2019; MAJEED et al., 2018). Um estudo (HENRIKSEN et al., 2015) não encontrou diminuição da dor após 14 semanas de utilização de corticosteroide, quando comparado ao grupo que recebeu placebo (MAJEED et al., 2018). De acordo com pesquisadores o ácido hialurônico não pareceu ser eficaz quando comparado a injeção de salina (VAN DER WEEGEN et al., 2015). Uma revisão concluiu que o

ácido hialurônico que tem seu uso pouco aceito (MAJEED et al., 2018). Há indícios de que a injeção intra-articular de ácido hialurônico seja menos eficaz na dor e funcionalidade do que o uso IA de inibidores de TNF alfa (OHTORI et al., 2015).

Outras terapias vêm sendo fortemente utilizadas. Um exemplo é o tapentadol, um fármaco analgésico de ação central que atua como agonista de receptor opioide e como inibidor de recaptção de norepinefrina. Existem diversos dados clínicos que apoiam o uso do fármaco em condições cirúrgicas e não cirúrgicas, e atribuem a não incorporação do tapentadol nas atuais diretrizes de tratamento da OA, devido a sua introdução no arsenal farmacológico da OA, comparado com outras terapias. Porém afirma-se que os estudos são favoráveis ao uso e foram realizados por grandes centros de pesquisa, o que confere segurança e confiabilidade aos dados disponíveis (RINONAPOLI; COACCIOLI; PANELLA, 2019).

Terapias biológicas também são apontadas como promissoras na terapia de OA, porém os estudos ainda são iniciais, sendo necessário o avanço das pesquisas para que seja feita uma análise mais coerente inclusive da segurança de uso. Um estudo com 32 participantes, utilizou injeção intra-articular de células derivadas da medula óssea dos próprios indivíduos para tratamento de OA. Os autores observaram melhora no primeiro mês após aplicação acompanhada de diminuição dos escores de avaliação ao longo dos 12 meses de acompanhamento. Também foi observado diminuição da sinovite, porém sem alteração no escore de avaliação do dano de cartilagem. Os autores relatam a não observação de efeitos adversos, porém apontam limitações no estudo, como ausência de grupo controle (GONCARS et al., 2019).

Existem apontamentos sobre a eficácia de fármacos inibidores de fator de crescimento na redução das dores, quando comparados a AINES convencionais, porém com incidência de 3,5% de eventos articulares considerados sérios, como osteonecrose e rápida progressão de OA (RPOA) após uso de anti-NGF (SCHNITZER et al., 2015). Uma revisão de 2016 afirma que não há associação entre osteonecrose e anti-NGF, mas existe forte associação entre essa terapia e RPOA (LANE; SHIDARA; WISE, 2017).

Terapias regenerativas usando fatores de crescimento vem sendo citadas na literatura (HUANG et al., 2019; MIYAGI et al., 2017; YU; HUNTER, 2016). Um ensaio clínico com a sprifermina avaliou, por ressonância magnética quantitativa, se haveria mudança na espessura da cartilagem articular após 6 e 12 meses de uso, os autores

apontam que observou-se diminuição da perda da espessura e volume articular total, de forma dose-dependente (LOHMANDER et al., 2014).

A injeção IA de plasma rico em plaquetas vem ganhando espaço nas pesquisas, porém apesar de algumas revisões apontarem melhora na dor (GOBBI; LAD; KARNATZIKOS, 2015; LAUDY et al., 2015), estudos maiores e com menos vieses são fortemente recomendados (LANE; SHIDARA; WISE, 2017). Novas terapias como plasma rico em plaquetas e anticorpos monoclonais precisam de maiores evidências para recomendação de seu uso (MAJEED et al., 2018).

A utilização de injeção de condrócitos expressando Fator de transformação do crescimento (TGF) beta 1, foi avaliada por 24 semanas e observou melhora na dor, em relação ao placebo, porém sem melhora funcional. Também houve relato de reação anafilática pós-administração. Os autores concluem que mais estudos são necessários (LEE et al., 2015).

As enzimas antioxidantes têm papel fundamental no processo fisiopatológico da OA. Um estudo buscou uma substância que regule positivamente a SOD 3 e avaliou se a SOD3 pode estimular a MEC em condições patológicas. Foram encontrados dados positivos em relação a proteção de condrócitos e a regulação positiva de SOD. O estudo foi realizado com culturas de células e modelos roedores, sendo necessários mais pesquisas para esclarecer aspectos importantes (SHI et al., 2019).

Terapias alternativas, incluindo o uso de produtos naturais também vem sendo estudados como terapia para OA. Shep e colaboradores (2019) compararam o efeito da cúrcuma com o diclofenaco e encontrou que ela foi mais segura e com efeitos semelhantes ao diclofenaco. O estudo utilizou 129 participantes avaliados a cada 2 semanas, por 4 semanas e procedeu a avaliação da dor e capacidade funcional. Apesar dos resultados positivos o estudo não contou com grupo controle (SHEP et al., 2019).

Existem artigos que apontam como essas terapias podem ser utilizadas no tratamento a OA. Existem estudos que descrevem as evidências de uso de algumas práticas complementares, a exemplo da acupuntura e Tai-Chi para indivíduos com OA (WANG, 2013). Em uma revisão, são apontados os usos de Medicina Complementar e Alternativa (MCA) para OA em diferentes países, sumarizando as evidências de tratamento e segurança de uso (KHAN et al., 2016). Essas revisões não abordaram o uso da própolis ou derivados de abelhas, tendo estes sido

analisados por um grupo da Colômbia. São citadas diversas propriedades e possíveis mecanismos de ação da geleia real, mel, pólen e própolis no tratamento da OA (JAGUA-GUALDRÓN; PEÑA-LATORRE; FERNADEZ-BERNAL, 2020). Para a própolis, os autores citam estudos que apontam as atividades anti-inflamatórias e antioxidantes como principais explicações para o uso da própolis como uma terapia alternativa para indivíduos portadores de OA. A própolis tem capacidade de diminuir a ativação de macrófagos e bloquear a atividade de NF- κ B, diminuindo o processo inflamatório, além de atuar reduzindo as reações de oxidação articular, o que pode facilitar o processo de regeneração da cartilagem (JAGUA-GUALDRÓN; PEÑA-LATORRE; FERNADEZ-BERNAL, 2020).

Esses dados são relevantes e por si, justificam o estudo e busca por produtos provenientes de abelha com poucos efeitos colaterais que atuem na redução da dor e na melhora funcional de indivíduos com OA de joelho. Estudos anteriores realizados pelo grupo de pesquisa (Moura-Sales, 2016), indicaram melhora do quadro de dor e restrição de movimento em indivíduos com tendinite e bursite de ombro tratados com EEPV. Este estudo também avaliou um pequeno número de indivíduos com osteoartrose, observando também melhora do quadro de dor e limitação de movimento.

2. OBJETIVOS

2.1 - Objetivo geral

- Avaliar a toxicidade e o efeito terapêutico do extrato etanólico da própolis vermelha de Alagoas em indivíduos com osteoartrose de joelho.

2.2 - Objetivos específicos

- Realizar análise fitoquímica da própolis vermelha de Alagoas;
- Mensurar toxicidade da própolis vermelha em macrófagos;
- Analisar a ocorrência de toxicidade aguda e crônica em modelo animal exposto ao extrato etanólico da própolis vermelha;
- Mensurar o tempo de vida útil da *D. melanogaster* exposta a diferentes concentrações do extrato etanólico de própolis vermelha;
- Medir a amplitude de movimento articular de indivíduos portadores de osteoartrose em uso do EEPV;
- Verificar a força muscular de membros inferiores de indivíduos portadores de osteoartrose em uso do EEPV;
- Analisar a intensidade da dor de indivíduos portadores de osteoartrose em uso do EEPV;
- Determinar o comprometimento funcional de indivíduos portadores de osteoartrose em uso do EEPV;
- Analisar a função hepática e renal por dosagem de marcadores sanguíneos em indivíduos normais em uso de EEPV.

3. METODOLOGIA

3.1 – Obtenção do EEPV

A amostra de própolis, produzida pela abelha europeia *Apis mellifera* Linnaeus, 1758, Hymenoptera, Apidae, foi coletado em janeiro de 2018, em um apiário na cidade de Japaratinga, Alagoas, Brasil (9 ° 07'.30 ", 35 ° 16'.58"). O extrato de própolis natural foi produzido de maneira artesanal, exatamente como feito pelos apicultores locais. A técnica consiste em colocar 300g de própolis bruta em processador, triturá-lo e colocar em um frasco com 1L de álcool de cereais (com 95% de concentração alcoólica) por 15 dias, abrigado da luz. Em seguida, filtrou-se utilizando papel de filtro.

O produto resultante deste processo foi concentrado em um rotaevaporador digital IKA RV 10 com acoplamento a uma bomba de vácuo (VALUE®). O procedimento foi realizado no Laboratório de Química Medicinal do Instituto de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), nas seguintes condições operacionais: 80 rpm; pressão de 600 mmHg e banho-maria (IKA HB 10) a temperatura de 45 °C, de maneira que se atingiu o peso seco de 75 mg/mL do extrato sendo esta a concentração usada para o ensaio clínico.

Para os ensaios com *D. melanogaster*, foi definido que 75 mg/mL corresponde a fração total (100%) do extrato, assim foram utilizados 5%, 10%, 15% e 20% desta fração nos diferentes ensaios realizados.

Para os ensaios *in vitro*, foi obtido o extrato seco e diluído em DMSO para se obter as concentrações de 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 50; 100 mg/mL.

3.2 - Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A cromatografia líquida acoplada ao detector de espectrometria de massa utilizando o modo orbitrap (LC-ESI-Orbitrap-FTMS) foi utilizada para identificar compostos de própolis vermelha. O EEPV foi diluído para uma concentração de 1 mg/mL e injetado 10 µL no LC-ESI-Orbitrap-FTMS. As condições da Thermo Scientific LC-ESI-Orbitrap-FTMS foram usadas de acordo com as condições descritas anteriormente por De Mendonça et al. (2015) durante as mesmas execuções analíticas das amostras de própolis vermelha do município de Marechal Deodoro-Alagoas (DE MENDONÇA et al., 2015). Os dados de LC-ESI-Orbitrap-

FTMS foram analisados usando o software MZmine. Os íons apresentavam intensidades superiores a 5×10^5 de abundância e no intervalo de 2,5 a 50,0 minutos foram extraídos, deisótopos, normalizados, filtrados, alinhados, submetidos à fórmula de predição para obter a fórmula molecular. Cada pico foi identificado pesquisando suas massas no dicionário de produtos naturais (versão 2013) e nas bibliotecas *on-line* da biblioteca interna, *chemspider* e *pubchem*.

3.3 - Manutenção de macrófagos:

Macrófagos da linhagem J774.A1 foram mantidos em garrafas de cultura contendo 10 mL de meio RPMI (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de SFB (Cultilab) e 2 mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich), aminoácidos não essenciais (Sigma-Aldrich) e piruvato (Sigma-Aldrich). No momento do uso, as células foram contadas, ajustadas em meio RPMI suplementado e semeadas em placas de 96 poços .

3.4 - Determinação da citotoxicidade para a célula hospedeira:

O estudo de citotoxicidade de macrófagos frente aos derivados foi realizado utilizando o método de redução de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) (HUSSAIN; NOURI; OLIVER, 1993; MOSMANN, 1983). Neste ensaio, macrófagos da linhagem J774.A1 foram plaqueados em placas de 96 poços por 1 hora em (10^5 /poço) e expostos a diferentes concentrações de EEPV (0,1; 0,5; 1; 5; 10; 50 e 100 μ M) por um período de 24 horas em estufa a 37°C com atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Os poços controles continham células cultivadas somente com meio de cultura ou células cultivadas na presença do veículo de diluição do EEPV (DMSO 0,1%). Após o período de incubação, o sobrenadante foi descartado e em seguida adicionado 100 μ L da solução de MTT (0,5 mg/mL). As placas foram novamente incubadas por um período de 1 hora em estufa a 37°C e a 5% de CO₂, logo após foi retirado o sobrenadante e adicionado em cada poço 100 μ L de DMSO para solubilizar o formazan produzido nas células viáveis. A leitura da concentração de formazan foi realizada utilizando a leitora de microplacas (Molecular Devices Ink) com comprimento de onda de 550 nm. As células tratadas nas diferentes concentrações do EEPV foram comparadas aos padrões de morte celular, DMSO e meio.

3.5 – *D. melanogaster*

Para os ensaios foram utilizados indivíduos adultos machos e fêmeas de *D. melanogaster* (Diptera, Drosophilidae) da linhagem *Canton Special* (CS), mantidas em cultura no Laboratório de Biologia do Desenvolvimento de *Drosophila*, no Instituto de Ciências Biológicas e Saúde (ICBS) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL). As *D. melanogaster* foram mantidas em tubos com meio de cultura padrão a temperatura controlada de 25°C.

3.6 - Padronização do meio experimental

3.6.1 - Adição de ágar

Para a manutenção do estoque foi utilizado meio padrão constituído de uma mistura de farinha de milho, levedo de cerveja, dextrose, sacarose, ágar, água, nipagim 10% e ácido propiônico. A montagem do meio experimental foi realizada adicionando ao meio padrão 0,5 gramas de ágar diluídos em 70 mL de água destilada e isto foi usado para diluir 250 mL de meio padrão, sem nenhuma diluição prévia. Todos os experimentos foram realizados com 3 mL de meio experimental por tubo, formado por 2,4 mL de meio padrão diluído, sendo o volume restante formado por água destilada, substância a ser testada ou ambos, para ajuste de volume final.

3.6.2 - Substâncias utilizadas

Para todos os ensaios apresentados foram utilizadas as seguintes produtos ou substâncias e concentrações: etanol (5%, 10%, 15% e 20%); Extrato etanólico de própolis vermelha (EEPV) nas concentrações já descritas; celecoxib (0,0038 mg/mL), além de um grupo controle não tratado, onde foram adicionados 0,6mL de água destilada. A definição da concentração de celecoxib se deu através de dados disponíveis na literatura (WU et al., 2017).

3.7 – Toxicidade aguda e crônica

Indivíduos adultos, machos e fêmeas, de 3 a 5 dias de idade da espécie *D. melanogaster*, nunca expostos a alimentos suplementados, foram transferidos após anestesia com gás carbônico (CO₂) 24 h antes do início do experimento, para tubos contendo 3 mL de meio experimental com as diferentes concentrações de álcool, celecoxib e EEPV. Para análise comparativa foi utilizado um grupo controle, sem

adição de qualquer substância. Para cada concentração foram utilizados 100 indivíduos adultos, divididos em 4 repetições. O número de mortes foi contado após 24h (DAVID; BOCQUET, 1977) para avaliação da toxicidade aguda e após 7 dias para avaliação da toxicidade crônica.

3.8 -Tempo de vida útil

Para analisar o tempo de vida útil de indivíduos adultos expostos as substancias testadas, moscas adultas com 3 a 5 dias de vida, expostas apenas ao meio padrão, foram separadas após anestesia por CO₂ por, no máximo, 5 minutos, e, após 24h de recuperação, foram alocadas em 4 grupos: controle, etanol, celecoxib e EEPV. Para cada grupo foram realizadas 4 repetições por concentração, totalizando 100 indivíduos por concentração. As moscas foram transferidas para meios novos duas vezes por semana, o número de mortes foi contado a cada troca.

3.9 - Ensaio clínico

A pesquisa clínica constituiu-se de um estudo de dois braços (EEPV e placebo), randomizado, duplo-cego, controlado por placebo, de fase 2 e 3, realizado durante 4 semanas, para validar a eficácia do EEPV na redução de dores articulares decorrente de osteoartrite. O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Alagoas (registro nº 2.059.400) e registro de pesquisa clínica nº RBR - 6ts54x. Os participantes foram informados dos objetivos e métodos de pesquisa e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) antes do início do protocolo de pesquisa. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as diretrizes e regulamentos existentes. Todos os participantes foram instruídos a usar 1 mL do produto uma vez ao dia à noite antes de dormir para atenuar possíveis interações alimentares.

3.9.1 - Randomização e cegamento

Os participantes foram aleatoriamente distribuídos (1:1) para receber própolis ou placebo usando um esquema de randomização em bloco com um tamanho fixo de quatro, gerados por um estatístico independente e colocados em um arquivo protegido por senha, indisponível para o pessoal do estudo responsável pela triagem

e recrutamento. O extrato utilizado no estudo e o placebo foram fornecidos em frascos numerados sequencialmente. Todas as avaliações foram realizadas por pesquisadores cegos para a alocação do tratamento.

3.9.2 - Participantes e critérios de elegibilidade

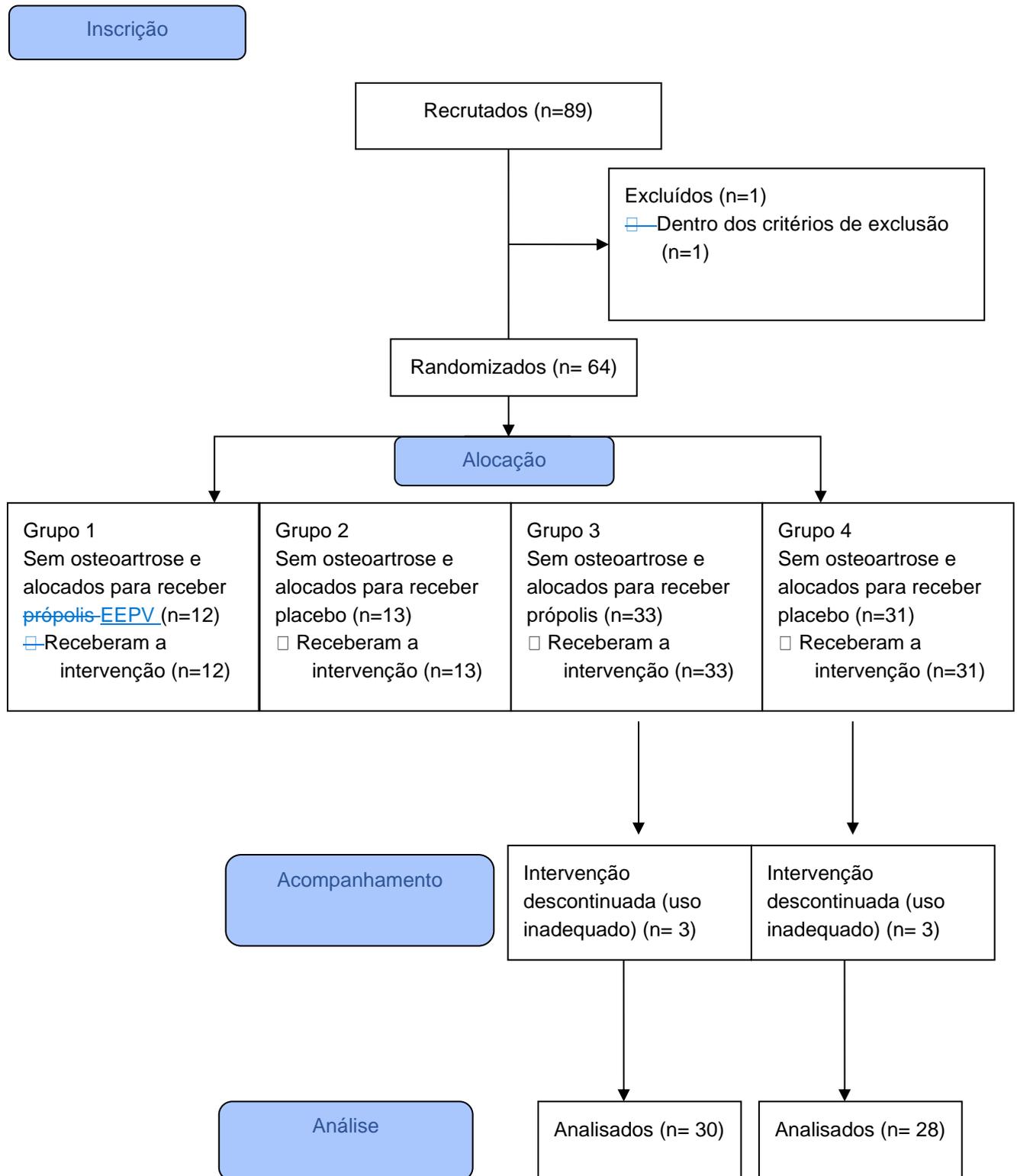
Para este estudo foram incluídas pessoas, de ambos os sexos e qualquer grupo étnico, com idade entre 40 e 65 anos que possuíam diagnóstico clínico de dor articular decorrente de osteoartrose por médico e presença de dor provocada pela doença citada durante a avaliação inicial. Também foram incluídos voluntários que não apresentavam diagnóstico clínico de OA, para análise da segurança de uso com avaliação da influência da própolis sobre os perfis bioquímicos hepáticos e renais.

Os critérios de exclusão foram: pacientes gestantes, com história de alergia a picadas de abelha e opoterápicos; história de hemorragia gastrointestinal, perfuração gástrica; doença renal, doença hepática; história atual de alcoolismo; uso de anticoagulantes; implantes de próteses ou marcapasso; doenças crônicas graves não controladas (hipertensão arterial, *diabetes mellitus*, cardiopatias e outras doenças que, por sua natureza ou pelo tratamento proposto, possam interferir com a avaliação proposta). Indivíduos que faziam uso de diversas terapias farmacológicas foram avaliados por profissional farmacêutico capacitado a perceber possíveis interações farmacológicas, decidindo pela inserção ou exclusão deste indivíduo na atual pesquisa.

3.9.3 - Amostra

A amostra foi composta de 83 indivíduos randomizados em 4 grupos, sendo os grupos 1 e 2 formados por indivíduos sem diagnóstico de osteoartrose que receberam EEPV (n=12) e placebo (n=13), respectivamente. Os outros 58 participantes possuíam diagnóstico de OA e foram divididos em dois grupos sendo 30 indivíduos no grupo 3 e 28 no grupo 4 sendo que ao grupo 1 foi ofertada a solução de própolis (EEPV) e ao grupo 2 foi ofertada a solução placebo. Um total de 17 participantes dos grupos 3 (n=10) e 4 (n=7) tiveram amostra de sangue coletada para análise dos perfis hepáticos e renais.

Figura 6 – Diagrama alocação dos participantes



3.9.4 - Coletas de sangue

Como parte de um projeto de dissertação de mestrado do discente Fabio Pacheco (orientando da Professora Doutora Magna S Alexandre-Moreira) do grupo do Laboratório de Farmacologia e Imunidade, apresentamos a seguir, parte de um estudo realizado na dissertação de mestrado do supra citado discente (dados em fase final de execução). Estes dados complementam os estudos sobre a ausência de toxicidade do EEPV.

3.9.4.1 - Preparo dos pacientes

Todos os participantes que consentiram a coleta de sangue durante o recrutamento foram orientados a permanecerem em jejum por 12h antes das coletas de sangue, que ocorreram num intervalo de 3h e foram realizadas por pessoas capacitadas. Todos os voluntários foram acomodados em sala de coleta de sangue, onde foram realizados os seguintes procedimentos pré coleta: acomodação do paciente, conferência da identificação do voluntário, questionamento sobre o cumprimento do jejum, uso de medicações e preferencias sobre local de coleta (braços direito ou esquerdo), na sequência, a devida identificação dos tubos de coleta com código de barras, a antisepsia no local da punção, feita com álcool a 70% e utilização do método de coleta a vácuo (FLEURY, 2016; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

3.9.4.2 - Coleta pelo método a vácuo

Para a avaliação laboratorial dos parâmetros bioquímicos hepáticos e renais, as amostras foram coletadas em tubos plásticos de 4 mL próprios para coleta à vácuo, com gel separador e ativador de coágulo fabricados por BD Vacutainer®. O procedimento de coleta nos pacientes foi realizado de acordo com o Ministério da Saúde (2001). Todos os tubos foram etiquetados com nome do voluntário, data e hora da coleta e um código de barras, gerado para o rastreamento das amostras durante o processamento.

Todas as amostras de sangue foram acondicionadas em caixa térmica de PVC, com gelo reciclável para refrigeração, a uma temperatura média entre 2 e 8 °C, monitorada por termômetro digital INCONTERM®, e foram imediatamente

encaminhadas para serem analisadas no laboratório de análises clínicas do Hospital Universitário Professor Alberto Antunes (HUPAA). Antes das análises, todos os equipamentos foram testados e calibrados, quando necessário. Após análise, as amostras foram acondicionadas em ultra freezer no Laboratório de Farmacologia e Imunidade (LAFI) da UFAL.

3.9.4.3 - Análise de perfis bioquímicos

A análise do efeito EEPV sobre os parâmetros bioquímicos de função hepática (AST e ALT) e renal (ureia e creatinina), foram determinados. Os dados foram comparados entre as amostras coletadas antes da avaliação (Av0), após 14 dias de utilização do produto (Av1), após 28 dias de utilização do produto (Av2) e após 30 dias da suspensão do uso (Av3), em todos os grupos.

Para as análises dos marcadores bioquímicos sorológicos, foi utilizado um analisador bioquímico automatizado ARCHITECT c8000 System, produzido por Abbott Laboratories. Os controles bioquímicos utilizados no analisador foram o Lymphocheck Assayed Chemistry Control Nível 1 e o Lymphocheck Assayed Chemistry Control Nível 2.

Na ocorrência de alguma não conformidade no resultado dos controles, os equipamentos eram calibrados e subsequentemente realizado novo processamento dos controles, na presença de normalidade dos resultados era dado início ao fluxo de exames das amostras da pesquisa.

Após centrifugação, realizada por cinco minutos a 3000 rpm, as amostras de soro eram encaminhadas até o analisador que processava os tubos de coleta de forma automatizada, de maneira que, uma vez inseridas no aparelho, as amostras eram identificadas a partir de seu código de barras pelo leitor interno do equipamento, dando início a quantificação dos analitos. Ao fim dos exames, era emitido um laudo com os resultados para apreciação do operador. Foram avaliados neste trabalho, os perfis bioquímicos das funções hepática (AST e ALT) e renal (UR, CR).

3.9.5 - Avaliação clínica e funcional

Após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), foi realizada a avaliação inicial, composta de preenchimento de ficha com dados de

identificação, avaliação funcional composta por mensuração da dor - pela escala de avaliação numérica (EAN) da dor -, medida da amplitude de movimento - utilizando a técnica de goniometria, avaliação da força muscular - pelo teste de força muscular manual, aplicação de questionário funcional de Lequesne.

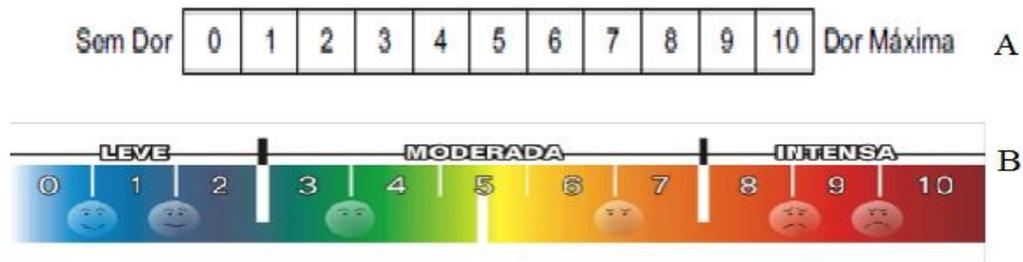
Após a avaliação foi entregue um frasco âmbar contendo a solução e as orientações para consumo de uma dose de 75mg de própolis por dia durante 4 semanas, além de uma ficha de preenchimento diário a respeito dos sinais e sintomas e possível identificação de reações adversas. Após a primeira avaliação, os participantes foram acompanhados quinzenalmente, até o fim do uso do opoterápico (4 semanas).

Todas as avaliações foram precedidas da observação do frasco entregue na avaliação inicial, com objetivo de certificar que o sujeito da pesquisa fez uso correto do produto e devolução da ficha de preenchimento diário. Os sujeitos foram orientados ainda a ingerir o extrato a cada 24 horas durante a pesquisa, no período noturno, antes de dormir.

3.9.5.1 - Medida de presença e intensidade da dor

A intensidade da dor foi avaliada utilizando-se a escala visual numérica da dor (EVN) (Figura 7). Essa escala consiste em uma linha horizontal, tendo numa extremidade a inscrição 'sem dor' e na outra a inscrição 'dor máxima'. Foi solicitado indivíduo quantificar a dor que sente informando um número de 0 a 10, explicando que zero corresponde à ausência total de dor e o 10 corresponde a maior dor já sentida por ele (HAWKER et al., 2011). Estudos que analisaram as diversas formas de avaliação da dor afirmam que a escala visual numérica da dor é altamente confiável e válida, principalmente em populações com baixo nível de instrução e em pacientes com dores crônicas (BURCKHARDT; JONES, 2003; GARZEDIN et al., 2008; HAWKER et al., 2011; HJERMSTAD et al., 2011).

Figura 7 – Escala Numérica de Dor (A). Adaptações aceitas para pacientes com menor escolaridade – Associação entre as escalas analógica de dor, visual numérica de dor e escala de faces (B)

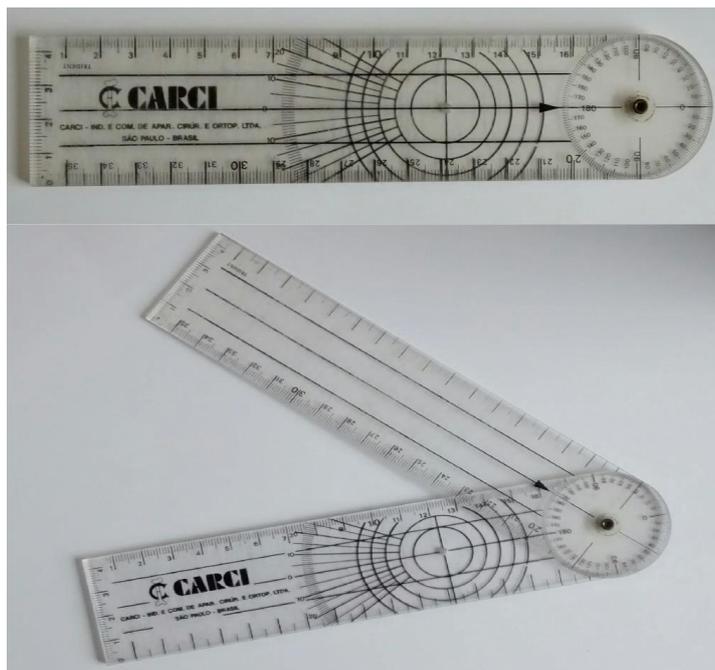


Fonte: Lima, 2016

3.9.5.2 - Amplitude de Movimento

A medida da amplitude de movimento foi realizada através de um goniômetro universal (Figura 8) da marca CARCI, um aparelho semelhante a um transferidor com dois prolongamentos, chamados de braços, que giram sobre um eixo, de simples utilização e baixo custo (GAJDOSIK; BOHANNON, 1987).

Figura 8 – Goniômetro Universal



Fonte: Autores (2020)

A goniometria é o método mais utilizado na prática clínica, assim como um dos mais citados na literatura, com relatos de estudos que datam de 1914 (BATISTA et al., 2006), este método se utiliza de um goniômetro para medir, de forma objetiva, a quantidade de movimento que determinada articulação é capaz de realizar (GOGIA et al., 1987; GROHMANN, 1983).

Durante a nossa revisão da literatura diversos artigos citaram que a confiabilidade intra-avaliador é maior quando comparada a confiabilidade inter-avaliador (BROSSEAU et al., 2001; ROTHSTEIN; MILLER; ROETTGER, 1983), estes achados nos levaram a eleger um único avaliador para todo o processo deste estudo. Para avaliação foram utilizados pontos anatômicos como referência e a medicação foi realizada com o participante em decúbito lateral, anulando a ação da gravidade sobre a articulação, de forma ativa e sempre pela mesma avaliadora.

3.9.5.3 - Força Muscular

A força muscular foi mensurada pelo teste de força muscular manual (CUTHBERT; GOODHEART, 2007; FRESE; BROWN; NORTON, 1987), com o participante colocado em posições com e sem influência da gravidade e com e sem resistência. Esse teste consiste em pedir para o paciente realizar o movimento solicitado de forma ativa, caso o paciente consiga realizar o arco de movimento contra a resistência da gravidade é solicitado que ele realize novamente o movimento, porém vencendo uma resistência manual distal a articulação, imposta pelo avaliador. (HISLOP; MONTGOMERY, 2008). O teste foi realizado pela mesma avaliadora em todas as avaliações e com comando claro e objetivo, seguindo um protocolo único, conforme recomendado na literatura (CUTHBERT; GOODHEART, 2007).

O resultado deste teste foi graduado conforme a escala de Lovett, apresentando 6 graduações de força muscular, onde 0 é ausência de contração muscular (plegia), 1 ocorre um esboço de contração muscular porém incapaz de mover ativamente a articulação (paresia), 2 há contração muscular, porém a musculatura não é forte o suficiente para promover movimento articular contra a gravidade, se retirarmos a ação da gravidade o paciente poderá mover a articulação sem grandes dificuldades (paresia), 3 há contração muscular, com força suficiente para mover a articulação contra a ação da força gravitacional, porém não é possível

vencer qualquer resistência aplicada, 4 a contração muscular é capaz de mover a articulação contra uma resistência manual proximal e 5 a contração muscular possui força suficiente para mover a articulação em teste contra uma resistência manual distal (O'SULLIVAN; SCHIMITZ, 2010).

3.9.5.4 - Questionário Funcional

Diversos estudos recentes em osteoartrose utilizam, além das usuais avaliações funcionais e escalas de intensidade da dor, questionários funcionais para avaliar, de forma ampliada e levando em consideração as diversas variáveis envolvidas, as respostas às intervenções propostas.

Para avaliação do nível de comprometimento funcional, foi utilizado o questionário funcional de Lequesne, um índice composto de 11 questões sobre dor, desconforto e função, sendo seis questões sobre dor e desconforto (sendo uma destas distintas para joelho e outra para quadril), uma sobre distância a caminhar e quatro distintas para quadril ou joelho sobre atividades da vida diária. As pontuações variam de 0 a 24, em faixas de classificação que vão desde a ausência de acometimento até o acometimento extremamente grave da função. (MARX et al., 2006).

3.10 - Análise estatística

Os dados obtidos foram tabulados no programa Excel (pacote office 2010) e analisados estatisticamente utilizando-se o software PRISM ver. 6, onde foram realizados teste ANOVA com nível de significância de 5% na análise de citotoxicidade, parâmetros bioquímicos, toxicidade em *D. melanogaster a* e dados clínicos, utilizando-se o pós teste de Tukey para dados normais e o pós teste de Dunnett para dados não normais de acordo com o teste de normalidade Shapiro-Wilk. Para o ensaio de Tempo de vida útil em *D. melanogaster*, foi utilizado o teste log-rank.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Análise química da própolis vermelha

Os dados de LC-ESI-Orbitrap-FTMS foram avaliados e comparados com os resultados descritos anteriormente (ALMEIDA; ALBUQUERQUE, 2002; DE MENDONÇA et al., 2015) para própolis vermelha de Alagoas-Brasil. Observa-se que esse tipo de própolis vermelha da região de Japaratinga-Alagoas, localizada a 160 km da região de Marechal Deodoro-Alagoas, apresenta em sua composição compostos fenólicos de isoflavonoides, chalconas, pterocaparpanos, isoflavonas, guttiferonas, terpenos na região tempo de retenção entre 2,9 e 18 minutos e que são semelhantes às amostras de própolis vermelha da região de Marechal Deodoro, mas outros compostos foram identificados no intervalo de tempo de retenção de 21 a 30,6 minutos em maior intensidade em comparação com a própolis vermelha da região de Marechal Deodoro (Figura 9). Outros compostos foram identificados com íons de 501,3 m / z (nemerossina e 6 epi-clausionona), 517,296 m / z (ocroparpinona B, hipercalina B), 533,291 m / z (hiperibona H, ocrocarpinona A), 667,4 m / z (Garciyunnanina B) (Tabela 2) e pode sugerir outros tipos de benzofenonas poliisopreniladas ainda não demonstradas na própolis vermelha de Alagoas.

Figura 9: Cromatograma da Própolis Vermelha de Alagoas

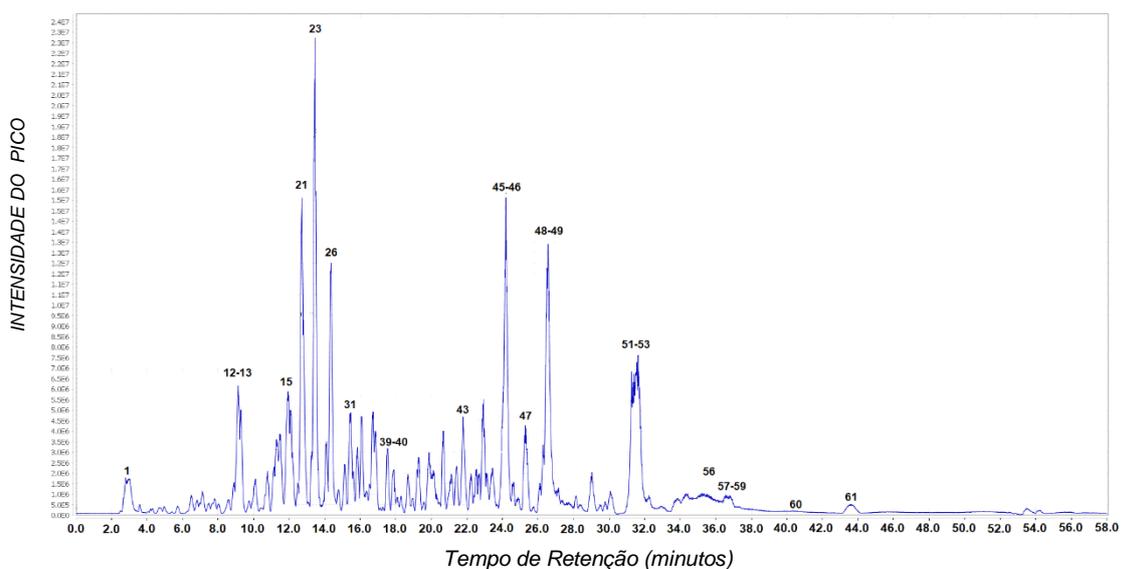


Tabela 2. Identificação e confirmação de alguns marcadores da própolis vermelha de Alagoas usando LC-ESI-Orbitrap-FTMS

| Pico | RT (min.) | [M-H] ⁻ (m/z) | PM | Fórmula | Componente |
|-------|-----------|--------------------------|---------|---|--|
| 1 | 2.95 | 179.0556 | 180.16 | C ₉ H ₈ O ₄ | Ácido Cafeico |
| 2 | 2.98 | 193.0502 | 194.18 | C ₁₀ H ₁₀ O ₄ | ácido Ferúlico |
| 3 | 3.00 | 178.0556 | 179.05 | C ₉ H ₈ O ₄ | Ácido Umbelico |
| 4 | 3.04 | 163.0243 | 164.16 | C ₉ H ₈ O ₃ | ácido p-coumarico |
| 5 | 3.10 | 475.1232 | 476.43 | C ₂₃ H ₂₄ O ₁₁ | 7-O-beta-glucopiranosil-4'-hidroxi-5-metoxi-isoflavona |
| 6 | 4.50 | 461.1023 | 462.40 | C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁ | 6-metoxiluteolina 7-ramnósido |
| 7 | 7.05 | 269.0811 | 270.24 | C ₁₅ H ₁₀ O ₅ | Genisteina |
| 8 | 7.35 | 285.0395 | 286.24 | C ₁₅ H ₁₀ O ₅ | Kampferol |
| 9 | 8.04 | 289.0711 | 290.27 | C ₁₅ H ₁₄ O ₆ | Catequina |
| 10 | 8.28 | 287.0553 | 288.25 | C ₁₅ H ₁₂ O ₆ | Dalbergoidina |
| 11 | 8.83 | 289.0711 | 290.27 | C ₁₅ H ₁₄ O ₆ | Epicatequina |
| 12 | 9.70 | 253.0499 | 254.24 | C ₁₅ H ₁₀ O ₄ | Liquiritigenina |
| 13 | 9.72 | 255.0654 | 256.27 | C ₁₅ H ₁₂ O ₄ | Daidzeina |
| 14 | 10.5 | 283.0384 | 284.26 | C ₁₆ H ₁₂ O ₅ | 2'-Hidroxisformononetina |
| 15 | 11.3 | 301.0810 | 302.30 | C ₁₇ H ₁₆ O ₇ | Quercetina |
| 16-17 | 11.9 | 271.0602 | 272.25 | C ₁₅ H ₁₂ O ₅ | Narigenin / Pinobanksin |
| 18 | 12.4 | 285.0758 | 286.24 | C ₁₅ H ₁₀ O ₆ | Calicosina |
| 19 | 12.8 | 521.1600 | 522.173 | C ₃₂ H ₂₆ O ₇ | Retusapurpurina B |
| 20 | 13.2 | 521.1600 | 522.173 | C ₃₂ H ₂₆ O ₇ | Retusapurpurina A |
| 21 | 13.4 | 255.0654 | 256.27 | C ₁₅ H ₁₂ O ₄ | Isoliquiritigenina |
| 22 | 13.7 | 317.067 | 318.28 | C ₁₆ H ₁₄ O ₇ | 6-Metil-dihidroquercetina |
| 23 | 13.8 | 267.0655 | 268.28 | C ₁₆ H ₁₂ O ₄ | Formononetina / Isoformononetina |
| 24 | 14.2 | 269.0812 | 270.28 | C ₁₆ H ₁₄ O ₄ | 4,4'-di-hidroxi-2-metoxialconona |
| 25 | 14.2 | 269.0812 | 270.32 | C ₁₆ H ₁₄ O ₄ | (7S)-dalbergifenol |
| 26 | 14.7 | 271.060 | 272.29 | C ₁₆ H ₁₆ O ₄ | Vestitol |
| 27 | 14.4 | 239.071 | 240.25 | C ₁₅ H ₁₂ O ₃ | 4,2'Dihidroxiqicone |
| 28 | 15.1 | 269.0813 | 270.28 | C ₁₆ H ₁₄ O ₄ | Pinostrobin |
| 29 | 15.1 | 269.0813 | 270.27 | C ₁₆ H ₁₄ O ₄ | Medicarpina |
| 30 | 15.5 | 253.087 | 254.28 | C ₁₆ H ₁₄ O ₃ | 6-Metoxiflavanona |
| 31 | 15.5 | 287.056 | 288.25 | C ₁₅ H ₁₂ O ₆ | 6-Hidroxinaringenina |
| 32 | 16.2 | 271.0607 | 272.29 | C ₁₆ H ₁₆ O ₄ | 2', 6'-di-hidroxi-4'-metoxi-di- |

| | | | | | |
|-----------|-------------|-----------------|----------------|--|--|
| | | | | | hydrochalcona |
| 33 | 16.2 | 283.0657 | 284.26 | C ₁₆ H ₁₂ O ₅ | Thevetiaflavona |
| 34 | 16.4 | 283.0603 | 284.26 | C ₁₆ H ₁₂ O ₅ | Biochanina A |
| 35 | 16.7 | 253.0865 | 254.25 | C ₁₅ H ₁₀ O ₄ | Crisina |
| 36 | 16.9 | 255.1019 | 256.27 | C ₁₅ H ₁₂ O ₄ | Pinocembrina |
| 37 | 17.0 | 539.1699 | 540.56 | C ₃₂ H ₂₈ O ₈ | 3', 4'-di-O-benzil-7-O- (2-hidroxietil) -3-O-metilquercetina |
| 38 | 17.9 | 285.113 | 286.32 | C ₁₇ H ₁₈ O ₄ | sativan |
| 39 | 18.2 | 285.1131 | 286.32 | C ₁₇ H ₁₈ O ₄ | (3S) -7-O-metilvestitol |
| 40 | 18.2 | 285.1131 | 286.32 | C ₁₇ H ₁₈ O ₄ | 7,3'-Di-hidroxi-4'-metoxi-8-metilflavano |
| 41 | 21.1 | 425.1603 | 426.71 | C ₃₀ H ₅₀ O | Cicloartenol / α-amina / β-amina |
| | | | | | 3,5,8,9-Tetra-hidroxi-6-metil-2,4,4-tris (4-metil-3-penten-1-il) -1 (4H) -anthracenona |
| 42 | 21.1 | 533.290 | 534.700 | C ₃₃ H ₄₂ O ₆ | Ocrocarpinona A |
| 43 | 21.8 | 517.296 | 518.684 | C₃₃H₄₂O₅ | Hipercalina B |
| 44 | 23.6 | 533.291 | 534.69 | C ₃₃ H ₄₂ O ₆ | Hiperibone H |
| 45 | 24.1 | 517.296 | 518.684 | C₃₃H₄₂O₅ | Ocrocarpinona B |
| 46 | 24.2 | 517.350 | 518.72 | C ₃₁ H ₅₀ O ₆ | 11α-hidroxi-termentato de metila |
| 47 | 25.0 | 617.348 | 618.80 | C ₃₈ H ₅₀ O ₇ | Gracinaliptona C |
| 48 | 25.2 | 519.311 | 520.70 | C ₃₃ H ₄₄ O ₅ | desconhecido |
| 47 | 25.5 | 617.3480 | 618.82 | C ₃₈ H ₅₀ O ₇ | 16-hidroxi-guttiferona K |
| 48 | 26.4 | 501.3010 | 602.70 | C₃₃H₄₂O₄ | Nemorosona |
| 49 | 26.6 | 501.3000 | 602.70 | C₃₃H₄₂O₄ | 6-Epi-clausionona |
| 50 | 30.6 | 667.400 | 668.90 | C ₄₃ H ₅₆ O ₆ | Garcinyunnanin B |
| 51 | 31.7 | 601.353 | 602.80 | C ₃₈ H ₅₀ O ₆ | Guttiferona F |
| 52 | 31.8 | 601.353 | 602.80 | C ₃₈ H ₅₀ O ₆ | Xantocimol |
| 53 | 31.9 | 601.353 | 602.80 | C ₃₈ H ₅₀ O ₆ | Guttiferona E |
| 54 | 34.1 | 347.223 | 348.52 | C ₂₂ H ₃₆ O ₃ | Ácido anacárdico (ácido 6-pentadecilsalílico) |
| 55 | 34.5 | 509.274 | 510.59 | C ₂₇ H ₃₈ O ₃ | Ácido makassárico |
| 56 | 35.4 | 585.358 | 586.80 | C ₃₈ H ₅₀ O ₅ | 6-Epi-Guttiferona J |
| 57 | 36.7 | 669.435 | 670.91 | C ₄₃ H ₅₈ O ₆ | Guttiferona C |
| 58 | 36.7 | 669.435 | 670.91 | C ₄₃ H ₅₈ O ₆ | Guttiferona D |
| 59 | 36.7 | 669.435 | 670.91 | C ₄₃ H ₅₈ O ₆ | Guttiferona B |
| 60 | 40.7 | 569.363 | 570.80 | C₃₈H₅₀O₄ | 13,14 Didehidroxiisogarcinol |
| 61 | 43.9 | 401.306 | 402.610 | C₂₆H₄₂O₃ | 1-Hidroxi-22-oxavitamina D3 |

RT: Tempo de Retenção (minutos), PM: Peso Molecular. **As substâncias em destaque não foram relatadas em outras própolis.**

Mais de 60 compostos foram identificados na própolis vermelha utilizada, sendo algumas substâncias nunca descritas para a própolis de Alagoas. Sabe-se que há uma grande variedade química na composição da própolis vermelha, o que confere grandes perspectivas terapêuticas a este produto (Bueno-Silva, 2015).

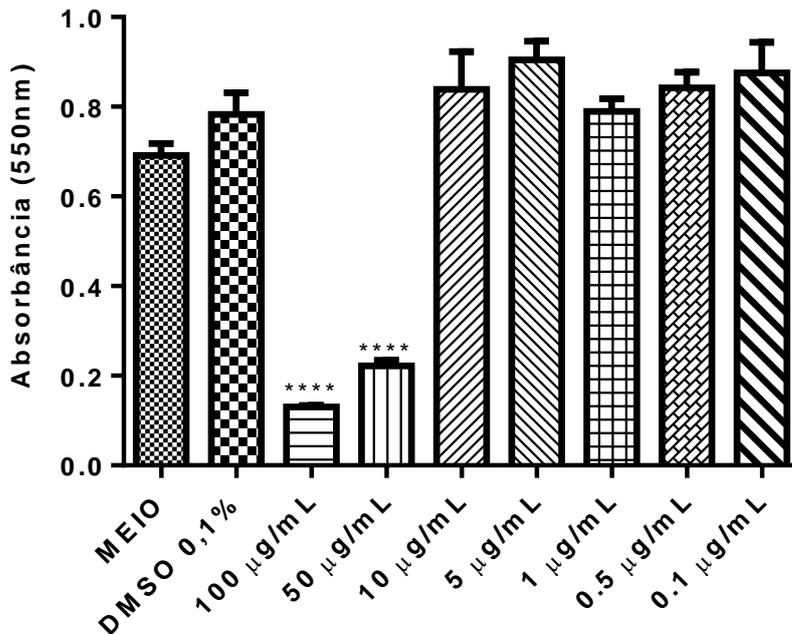
De acordo com o HPLC realizado, a própolis utilizada neste estudo é a própolis vermelha, cujas principais substâncias encontradas, foram os flavonoides formononetina, liquiritigenina, vestitol e quercetina (Figura 9 e Tabela 2), todos já descritas como anti-inflamatórias agindo em diferentes momentos deste processo (BUENO-SILVA et al., 2013, 2015, 2016, 2017; RUFATTO et al., 2018). Os compostos encontrados confirmam a classificação desta como própolis vermelha principalmente pela presença de isoflavonoides, considerados marcadores químicos da própolis vermelha (SILVA et al., 2008).

Alguns compostos identificados na própolis vermelha de Japaratinga não foram relatados em outras amostras de própolis vermelha de Alagoas, a exemplo da nemerosona (Pico 48) , 6 epi-clausionona (Pico 49), ocroparpinona B (Pico 45), hipercalina B (Pico 43), hiperibona H (Pico 44), Garcianyunnanina B (Pico 50) e 13,14 Didehidroxiisogarcinol (Pico 60). Supomos assim, que a própolis de Japaratinga contém substâncias que possam ser de outra fonte botânica do gênero *Garcinia* ou de outro gênero da família *Clusiaceae*. O levantamento botânico dessa região revela uma alta diversidade de espécies na área próxima do apiário, situada na borda de um fragmento da Mata Atlântica costeira, incluindo pelo menos duas espécies de *Clusiaceae* (KACURIN, 2019). Os dados botânicos podem corroborar a composição química desse subtipo de própolis vermelha rica em benzofenona, poliisoprenilada, indicando que as abelhas Japaratinga também podem visitar plantas de *Clusiaceae* além da espécie *Dalbergia ecastophyllum*.

4.2 - Citotoxicidade

A avaliação da toxicidade do EEPV de Alagoas em macrófagos J774A.1 na presença de 0.1 - 100 µg /mL de EEPV por 24 h foi medida pelo teste MTT (Figura 10). A EEPV nas concentrações de 0,1 – 10 µg /mL não exerceu efeito citotóxico. As concentrações de 50 µg /mL e 100 µg /mL, foram consideradas citotóxicas, em

relação ao controle, de forma estatisticamente significativa ($p < 0,0001$). Figura 10: Efeito de EEPV na viabilidade de macrófagos J774A1. A citotoxicidade foi avaliada pelo ensaio MTT após 24 h de incubação de Células J774A.1 com 0,1 - 100 $\mu\text{g} / \text{mL}$ de EEPV.



Nota: **** $p < 0,0001$.

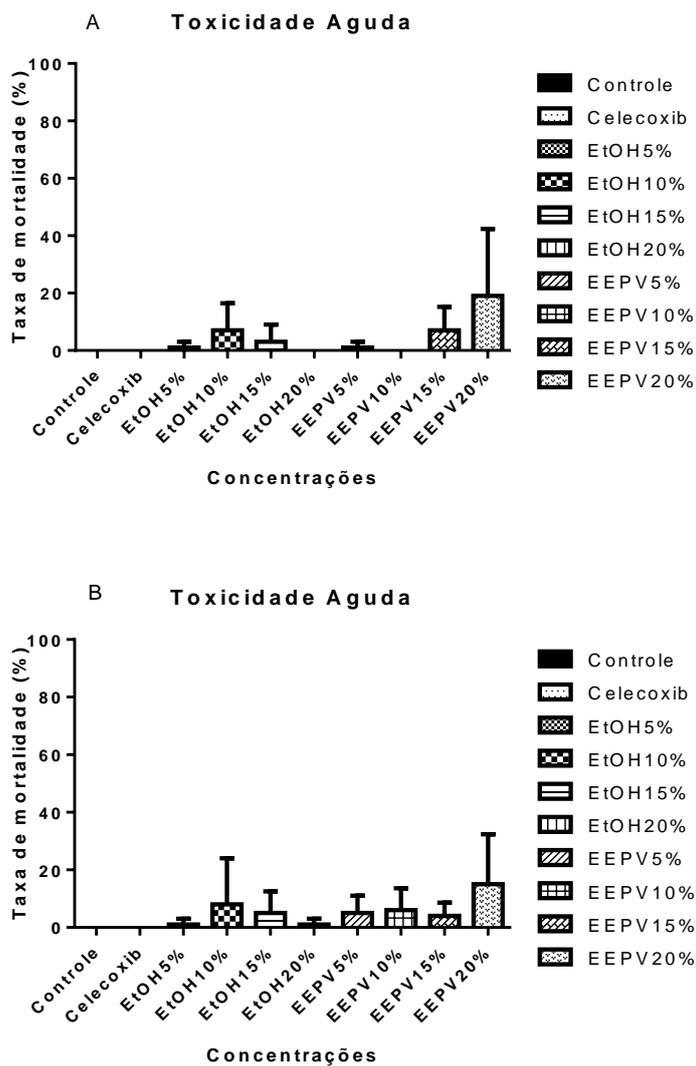
Um estudo avaliou o efeito da própolis verde brasileira em macrófagos J774.A1 e não encontrou citotoxicidade nas concentrações até 50 $\mu\text{g} / \text{mL}$ (SZLISZKA et al., 2013). Bueno-Silva et al. (2015) avaliando a própolis vermelha de Alagoas, evidenciou toxicidade em macrófagos apenas nas concentrações acima de 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (BUENO-SILVA et al., 2015). Outro ensaio, também utilizando macrófagos (BÚFALO et al., 2013) apontou efeito tóxico nas concentrações de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, esses dados corroboram a nossa análise de citotoxicidade. Nossos dados corroboram o que é encontrado na literatura, indicando baixa toxicidade da própolis em Macrófagos.

4.3 - Toxicidade aguda e crônica em *D. melanogaster*

Os resultados indicam que após 24 h e de exposição oral, o número de mortes de machos e fêmeas foi relativamente maior na concentração de 20% de

EEPV quando comparado as demais concentrações, sendo de 32% para fêmeas e 43% para machos, porém sem significância estatística tanto em indivíduos adultos machos, quanto em fêmeas. Assim, de forma aguda, a exposição ao extrato etanólico de própolis vermelha não foi capaz de gerar toxicidade (Figura 11).

Figura 11: Avaliação da taxa de mortalidade aguda de indivíduos adultos machos (A) e fêmeas (B) de *D. melanogaster*.

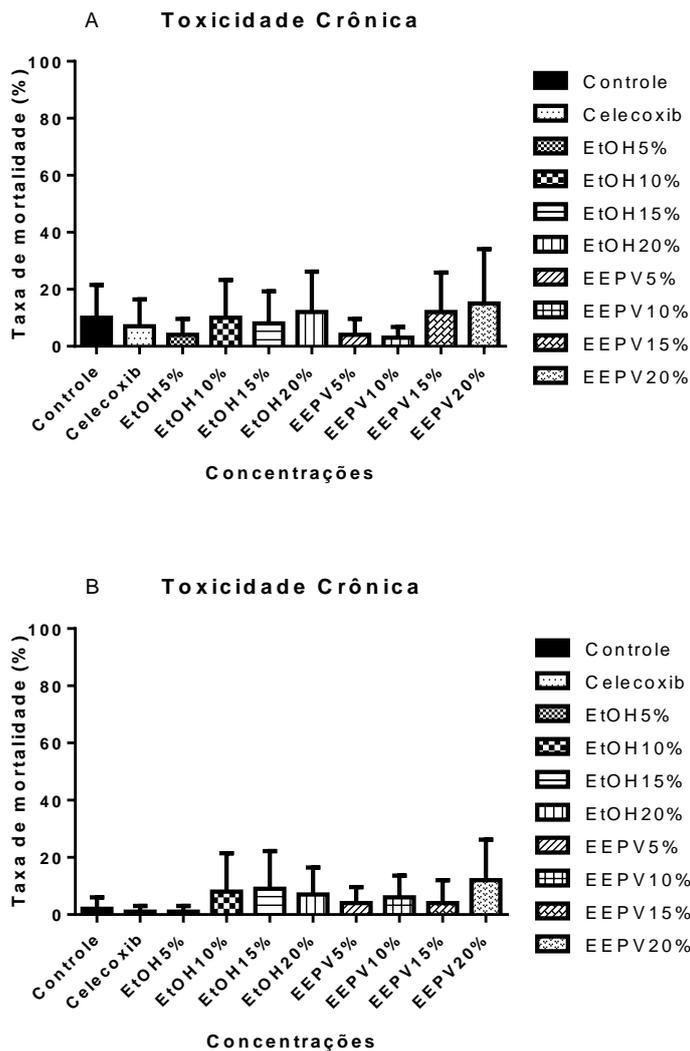


Nota: Para análise estatística foi realizado ANOVA (Tukey test). Não houve diferença estatisticamente significativa entre as concentrações utilizadas.

Na análise da toxicidade crônica, após 7 dias de exposição oral, também não foi observada atividade tóxica de EEPV em comparação ao controle positivo e negativo, sendo a maior taxa de mortalidade apresentada no EEPV a 20% tanto

para machos (40%), quanto para fêmeas (28%), porém sem diferença estatisticamente significativa em relação as demais concentrações utilizadas (Figura 12).

Figura 12: Avaliação da taxa de mortalidade crônica de indivíduos adultos machos (A) e fêmeas (B) de *D. melanogaster*.



Nota: Para análise estatística foi realizado ANOVA (Tukey test). Não houve diferença estatisticamente significativa entre as concentrações utilizadas.

Existem poucos dados sobre a toxicidade da própolis neste modelo experimental, Um estudo que avaliou a toxicidade de extratos aquosos de diferentes tipos de própolis, indicam ausência de efeitos tóxicos desses extratos em *D.*

melanogaster (CARDOSO et al., 2015; VALADARES; GRAF; SPANÓ, 2008; VALADARES; SPANÓ; NEPOMUCENO, 2004). Nossos dados corroboram o que é apresentado na literatura, sendo a própolis uma substância pouco tóxica após exposição aguda via oral.

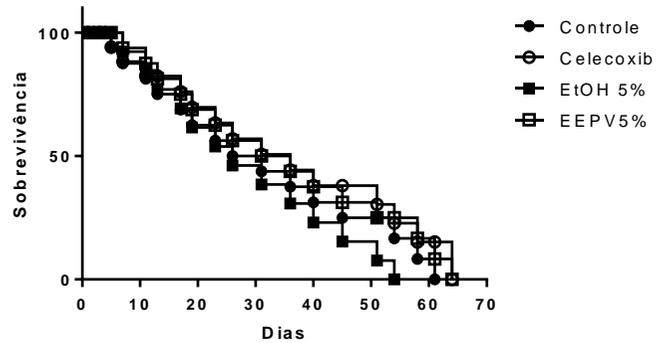
4.4 - Tempo de vida útil de *D. melanogaster* após exposição oral de EEPV

Nossos dados indicam que a própolis não alterou o tempo de vida útil de indivíduos machos e fêmeas de *D. melanogaster*. Para indivíduos machos, apenas ocorreu diferença estatisticamente significativa na comparação entre o controle celecoxib e concentração de 10% de EEPV, sendo essa não diferente estatisticamente do controle negativo (Figura 9). Para indivíduos fêmeas, os resultados apontam que o etanol a 5% pode ser considerado tóxico quando comparado ao controle, enquanto a concentração de 5% de EEPV não alterou significativamente o tempo de vida útil quando comparado ao controle e apresentando maior tempo de vida útil que o álcool a 5%. Também foi possível observar que o álcool a 20% foi tóxico quando comparado ao controle. Não houve diferença estatisticamente significativa em relação aos demais parâmetros (Figuras 13 e 14).

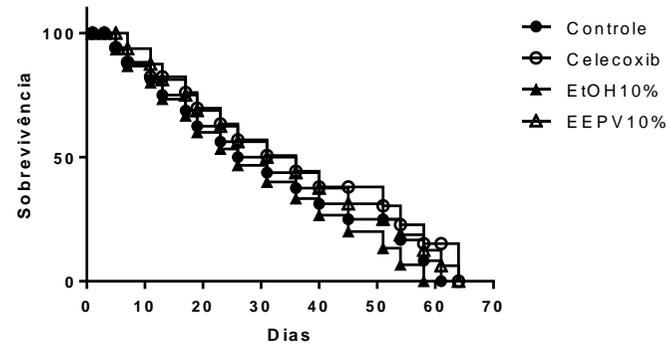
Ensaio de sobrevivência são bons indicadores de capacidade tóxica de substâncias. Uma revisão apontou que a extensão na sobrevivência das moscas sugere um efeito positivo da substância testada, neste aspecto (PANCHAL; TIWARI, 2017). Nossos achados indicam que, estatisticamente, moscas expostas ao meio controle ou a diferentes concentrações de própolis vermelha não apresentam diferença no seu tempo de vida útil, indicando baixa toxicidade de uso do extrato. A diferença estatística evidenciada entre celecoxib e 20% de EEPV pode ser explicada pelo breve aumento do tempo de vida útil em decorrência da exposição ao celecoxib, já relata na literatura (WU et al., 2017). Ensaio com diferentes AINES também evidenciam que estes são capazes de prolongar levemente o tempo de vida útil da *D. melanogaster* (DANILOV et al., 2015; HE et al., 2014).

Figura 13: Avaliação do tempo de vida útil de indivíduos machos de *D. melanogaster* expostos a diferentes concentrações de EEPV e etanol.

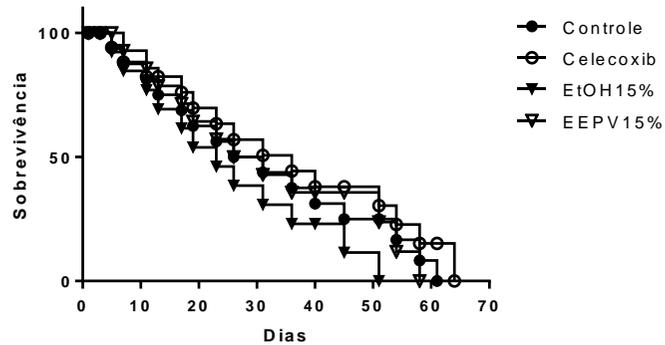
Sobrevivência de machos expostos a EPV a 5%



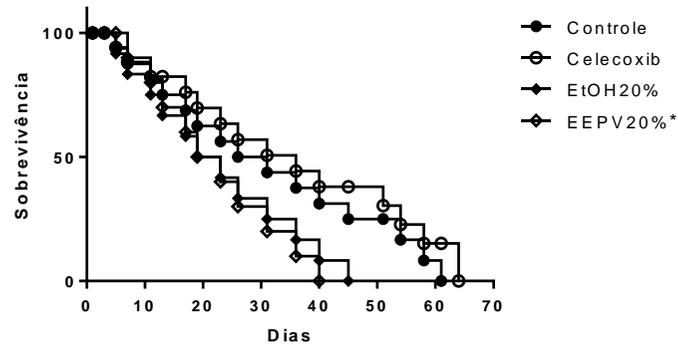
Sobrevivência de machos expostos a EPV a 10%



Sobrevivência de machos expostos a EPV a 15%



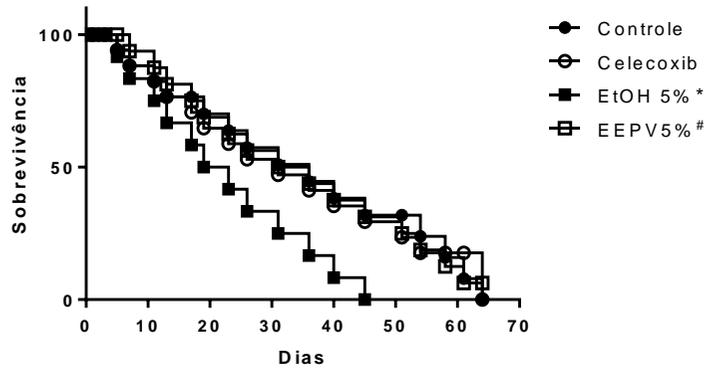
Sobrevivência de machos expostos a EPV a 20%



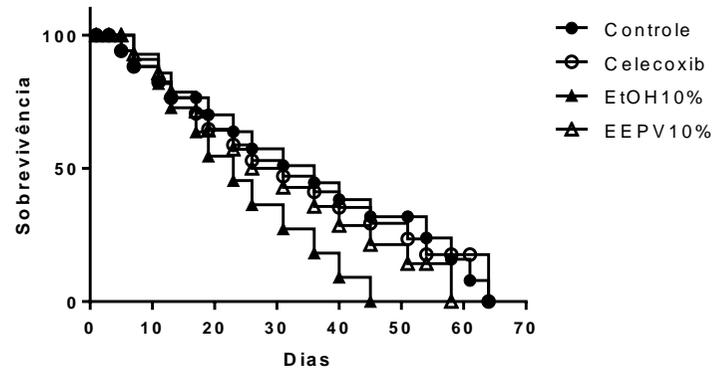
Não houve diferença significativa entre o tempo e vida útil das concentrações utilizadas, quando comparado ao controle negativo. * $p < 0,05$ (em comparação com o controle positivo de celecoxib).

Figura 14: Avaliação do tempo de vida útil de indivíduos fêmeas de *D. melanogaster* expostos a diferentes concentrações de EEPV e Etanol.

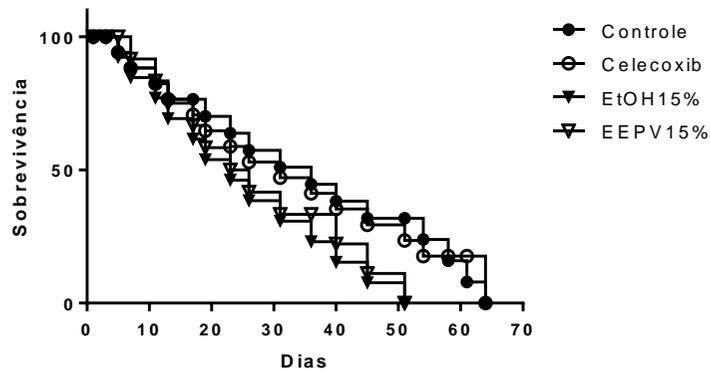
Sobrevivência de fêmeas expostas a EPV a 5%



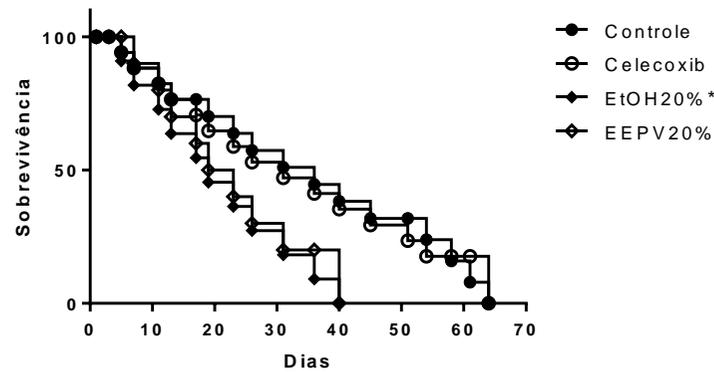
Sobrevivência de fêmeas expostas a EPV a 10%



Sobrevivência de fêmeas expostas a EPV a 15%



Sobrevivência de fêmeas expostas a EPV a 20%



* $p < 0,05$ (em relação ao controle negativo). # $p < 0,05$ (Entre a concentração de EEPV e Etanol correspondente).

Estudos apontam que substâncias reconhecidamente tóxicas como cádmio e herbicidas, possuem efeito de reduzir o tempo de vida útil (GALIN; AKHTYAMOVA; PASTUKHOVA, 2019; YANG et al., 2020), enquanto alguns produtos naturais, também ricos em flavonoides foram capazes de aumentar ou não alterar esse parâmetro em *D. melanogaster* (CHEN et al., 2018; TANG et al., 2019)

4.5 - Pesquisa clínica

Foram incluídos 83 indivíduos, divididos em 4 grupos, sendo os grupos 1 e 2 compostos por indivíduos sem diagnóstico de osteoartrose que receberam EEPV (n=12) e placebo (n=13), respectivamente, e os grupos 3 e 4 formado por indivíduos com diagnóstico de osteoartrose, sendo o grupo 3 formado por indivíduos que usaram o EEPV (n=30) e o grupo 4 por indivíduos que usaram o placebo (n=28). Todos os participantes realizaram a primeira avaliação, porém 6 interromperam o uso com suspensão do TCLE. Destes, 3 eram do grupo que recebeu a solução placebo, todas por uso irregular da solução e solicitarem a suspensão do uso. Enquanto no grupo que recebeu o EEPV, 3 participantes solicitaram suspensão do TCLE, devido a não utilização do produto da forma orientada (n=3) (Figura 6).

Nossos dados apontam ausência de efeito hepatotóxico e nefrotóxico após 28 dias de utilização de 75mg/mL de EEPV em indivíduos com e sem osteoartrose. Este estudo demonstrou ainda que a utilização do EEPV, por 4 semanas, teve efeito de alívio da dor, melhora da amplitude de movimento e da funcionalidade em pacientes com OA do joelho em comparação com o grupo placebo. No geral, esses efeitos positivos podem ser atribuídos ao baixo efeito tóxico dos flavonoides e as atividades anti-inflamatórias e antioxidantes da própolis vermelha de Alagoas.

Poucos estudos clínicos sobre a própolis e doenças articulares estão disponíveis. Os dados que relacionam o potencial terapêutico deste produto em doenças articulares advêm de ensaios *in vitro* ou com diferentes modelos animais.

Os ensaios clínicos predominantes com o uso de própolis são relacionados a odontologia, como o estudo que avaliou a eficácia da própolis na redução da gengivite e observou que após 28 dias os parâmetros analisados foram melhores no grupo que usou a própolis, em comparação com clorexidina e placebo. O grupo que recebeu a própolis também apresentou menos efeitos colaterais que os demais grupos (ANAUATE-NETTO et al., 2014).

A ocorrência de desistências ao longo de uma pesquisa clínica é comumente relatada (MÖCKS et al., 2002). Em ambos os grupos deste estudo houve pedidos de suspensão do TCLE, sendo o uso incorreto do produto a causa única de descontinuidade do acompanhamento.

4.6 - Caracterização da amostra.

A maioria dos participantes foi composta por mulheres (n=48), sendo 23 (76,6%) do grupo que recebeu EEPV e 25 (89%) do grupo que recebeu placebo. A média de idade do grupo EEPV foi de 56,2 anos ($\pm 7,3$) e no grupo placebo de 56,8 ($\pm 6,5$). Nos dois grupos a maior parte dos participantes era destro, porém o lado mais acometido foi o esquerdo. A maior parte dos participantes desta pesquisa tinha acesso a assistência à saúde exclusivamente pelo SUS, e renda per capita menor que R\$1000/mês (Tabela 3).

Tabela 3 – Caracterização da amostra de indivíduos com diagnóstico de osteoartrose que concluíram a pesquisa clínica

| | EEPV (n=30) | Placebo (n=28) |
|----------------------------|--|--------------------------------|
| Sexo (Feminino) | 76,6% | 89% |
| Idade | 56,2 (7,3) | 56,8 (6,5) |
| Destros | 93,30% | 89% |
| Lado Acometido | | |
| D | 46,60% | 46,40% |
| E | 53,30% | 53,60% |
| Acesso ao sistema de saúde | 60% SUS | 71,4% SUS |
| Renda | 70% Renda per capita de menos de 1000 reais | 75% com renda menos de 1000 |

Os estudos apontam que a maioria das pessoas acometidas por OA são do sexo feminino (HUNTER; BIERMA-ZEINSTRA, 2019), nosso estudo encontrou que, 82,76% (n=48) dos participantes eram mulheres com idade média de 56 anos.

Achados semelhantes foram encontrados em outros estudos clínicos envolvendo pessoas com artrose (THORLUND et al., 2019), diferindo na questão da idade, pois optamos por restringir a idade máxima de participação visando a

segurança dos participantes, visto que apesar de estudos mostrarem a ausência de interação entre a própolis e vários fármacos (CUSINATO et al., 2019), a própolis tem composição variável (BURDOCK, 1998) e essa segurança não está estabelecida para todos os componentes e fármacos disponíveis no mercado.

Estudos que analisaram as diversas formas de avaliação da dor afirmam que a escala visual numérica da dor é altamente confiável e válida, principalmente em populações com baixo nível de instrução e em pacientes com dores crônicas (BURCKHARDT; JONES, 2003; GARZEDIN et al., 2008; HAWKER et al., 2011; HJERMSTAD et al., 2011). Downie e colaboradores (1978) afirmam ainda que os erros de medição são menos comuns na Escada de Avaliação Numérica (EAN) e, por isso, ela deve ser a escolhida, em termos de escalas unidimensionais de avaliação da dor (DOWNIE et al., 1978).

É possível afirmar que a Escala Visual Analógica (EVA) e a Escada de Avaliação Numérica (EAN), são correspondentes e de fácil aplicação, sendo a EAN de mais fácil aplicação que a EVA, principalmente em indivíduos idosos e não alfabetizados (BURCKHARDT; JONES, 2003; HJERMSTAD et al., 2011). Estes fatores fortalecem a escolha do nosso grupo em optar pela utilização da Escala de Avaliação Numérica da dor para avaliação unidimensional deste parâmetro.

4.7 Toxicidade hepática e renal

A análise das concentrações de AST, ALT, ureia e creatinina em indivíduos com e sem osteoartrose de joelho em uso de EEPV ou placebo por 28 dias, nos permitiu avaliar se existem alterações significativas nestes parâmetros podendo indicar algum padrão de toxicidade ou proteção da própolis vermelha.

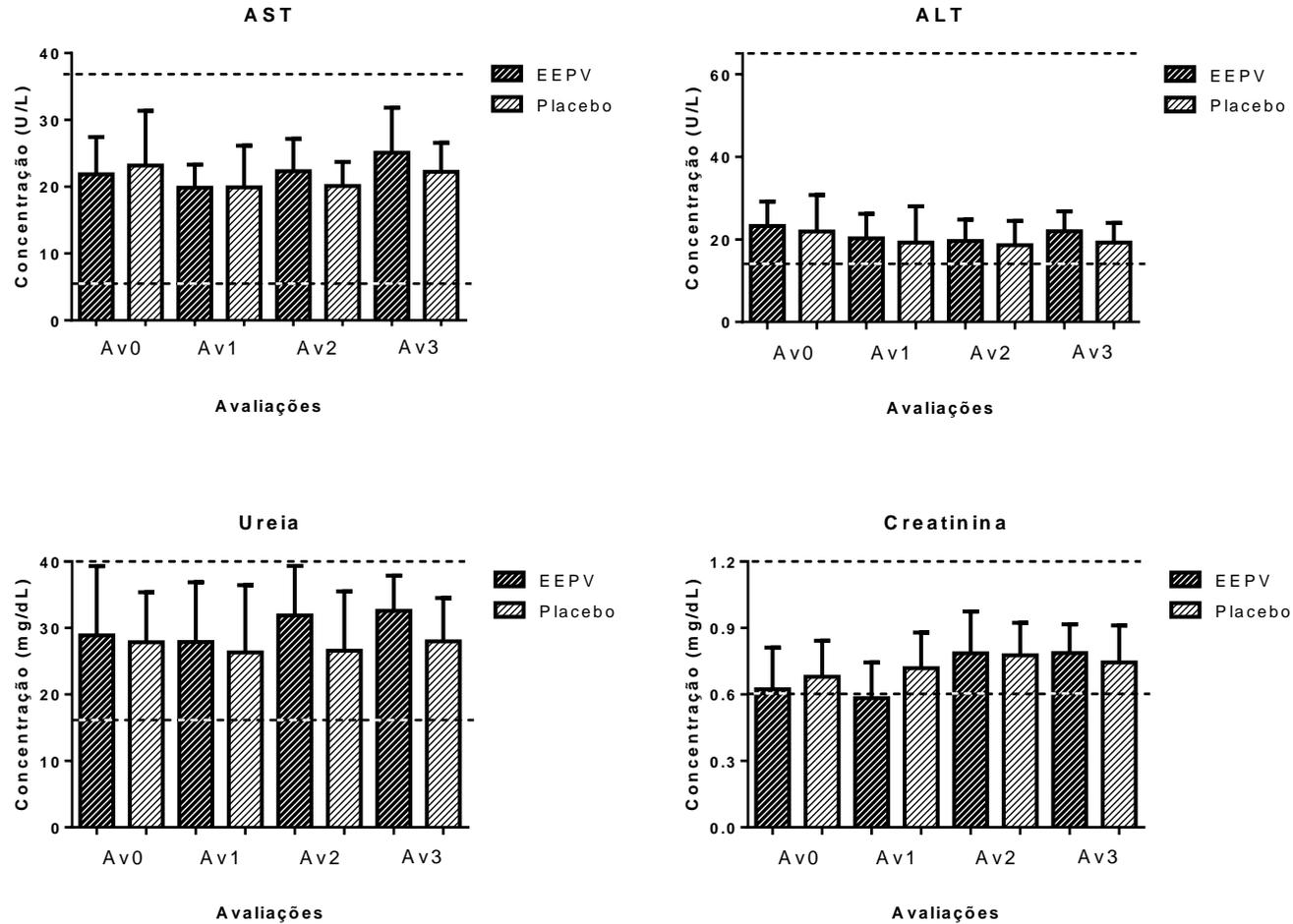
Em indivíduos não portadores de OA, o nível sérico da enzima AST apresentou discretas variações ao longo do uso do EEPV (21,88 U/L \pm 5,59 na Av0, 19,84 U/L \pm 3,47 na Av1 e 22,34 U/L \pm 4,85 na Av2) e do placebo (23,17 U/L \pm 8,2 na Av0, 19,91 U/L \pm 6,25 na Av1 e 20,13 U/L \pm 3,60 na Av2), porém ainda dentro dos valores de referência adotados (5 – 37 U/L) e sem diferença estatisticamente significantes entre as avaliações ou entre os grupos (Figura 15). A análise da atividade destas enzimas após 30 dias de suspensão do uso do produto (Av3), também não evidenciou diferença estatisticamente significantes entre os grupos (25,10 U/L \pm 6,71 para EEPV e 22,22 U/L \pm 4,38 para placebo), ou em comparação

com o período de uso (Figura 15). As dosagens séricas de ALT também não indicam variação significativa de sua atividade em indivíduos sem OA que durante ou após o uso de EEPV (23,25 U/L \pm 5,9 na Av0, 20,27 U/L \pm 5,93 na Av1, 19,59 U/L \pm 5,22 na Av2 e 21,98 U/L \pm 4,82 na Av3) ou placebo (21,90 U/L \pm 8,89 na Av0, 19,23 U/L \pm 8,79 na Av1, 18,58 U/L \pm 5,89 na Av2 e 19,22 U/L \pm 4,79 na Av3), mantendo-se dentro dos valores de referência adotados (14 – 63 U/L) (Figura 15).

Entre os indivíduos sem OA não houve alterações dos de função renal após 14 ou 28 dias de utilização do EEPV ou do placebo, sendo observadas pequenas variações nas médias das concentrações de ureia (28,89 mg/dL \pm 10,42 na Av0, 27,90 mg/dL \pm 8,98 na Av1, 31,88 mg/dL \pm 7,48 na Av2 para o grupo que usou EEPV e 27,84 mg/dL \pm 7,55 na Av0, 26,31 mg/dL \pm 10,13 na Av1, 26,58 mg/dL \pm 8,93 na Av2 para os indivíduos que usaram placebo) e creatinina (0,62 mg/dL \pm 0,19 na Av0, 0,58 mg/dL \pm 0,16 na Av1, 0,79 mg/dL \pm 0,19 na Av2 para o grupo que usou EEPV e 0,68 mg/dL \pm 0,16 na Av0, 0,72 mg/dL \pm 0,16 na Av1, 0,78 mg/dL \pm 0,15 na Av2 para os indivíduos que usaram placebo), porém dentro dos valores de referência utilizados (10 - 50 mg/dL para Ureia e 0,6 – 1,3 mg/dL para Creatinina). Os dados ainda apontam que, após 28 dias de suspensão do uso, o comportamento das concentrações de ureia (32,58 mg/dL \pm 5,30 e 27,97 mg/dL \pm 6,55, para EEPV e placebo respectivamente) e creatinina (0,79 mg/dL \pm 0,13 e 0,74 mg/dL \pm 0,17 para EEPV e placebo respectivamente) apesar da discreta variação, se mantiveram dentro dos valores de referência e não diferenciaram estatisticamente dos valores de concentração obtidos durante a intervenção (Figura 15).

A observação das concentrações médias das transaminases hepáticas AST ALT, em indivíduos portadores de OA, indica que neste conjunto de resultados não houve alterações estatisticamente significantes nos níveis séricos destas ao longo das avaliações nem para os participantes que receberam EEPV (AST = 23,77 U/L \pm 6,73 e ALT 25,88 U/L \pm 8,10 na Av0, AST = 22,85 U/L \pm 6,53 e ALT 21,27 U/L \pm 7,84 na Av1, AST = 23,15 U/L \pm 6,53 e ALT 21,60 U/L \pm 6,16 na Av2 e AST = 21,47 U/L \pm 7,02 e ALT 19,65 U/L \pm 8,44 na Av3), nem para os que receberam o placebo (AST = 24,73 U/L \pm 7,17 e ALT 23,90 U/L \pm 5,61 na Av0, AST = 24,4 U/L \pm 7,22 e ALT 19,13 U/L \pm 8,07 na Av1, AST = 23,24 U/L \pm 3,80 e ALT 20,96 U/L \pm 7,73 na Av2 e AST = 23,49 U/L \pm 5,72 e ALT 19,99 U/L \pm 6,65 na Av3), não tendo sido observados resultados acima dos valores de referência para essas enzimas (Figura 16).

Figura 15: Dosagens dos níveis séricos de AST, ALT, Ureia e Creatinina dos indivíduos sem diagnóstico clínico de Osteoartrose

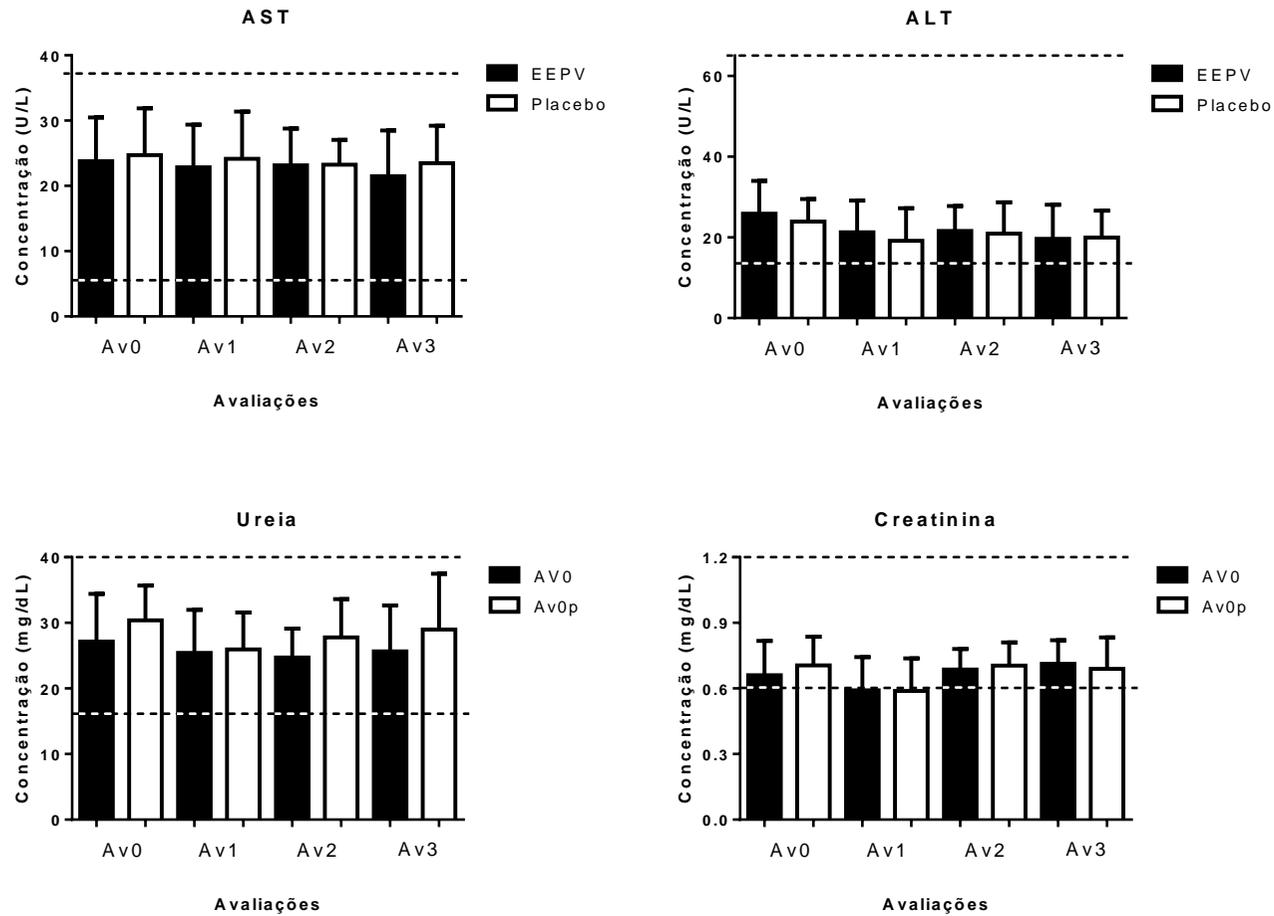


As linhas tracejadas indicam os valores de referência adotados.

Também não foram observadas indicações de toxicidade renal em indivíduos portadores de OA, que fizeram uso de EEPV ou placebo (Figura 16). Nestes indivíduos, os níveis de séricos de Ureia entre os que usaram EEPV variaram de 27,16 mg/dL \pm 7,26 na Av0, 25,42 mg/dL \pm 6,55 na Av1, 24,70 mg/dL \pm 4,43 na Av2 e 25,65 mg/dL \pm 7 na Av3, enquanto nos grupo que recebeu placebo, os valores séricos encontrados foram de 30,37 mg/dL \pm 5,32 na Av0, 25,94 mg/dL \pm 5,66 na Av1, 27,78 mg/dL \pm 5,85 na Av2 e 29 mg/dL \pm 8,47 na Av3, permanecendo dentro dos valores de referencia e sem diferença significativa entre as avaliações ou entre os grupos. Os níveis de creatinina também se apresentaram dentro dos valores de referência para indivíduos que usaram EEPV (0,66 mg/dL \pm 0,16 na Av0, 0,59 mg/dL \pm 0,15 na Av1, 0,69 mg/dL \pm 0,09 na Av2 e 0,71 mg/dL \pm 0,11 na Av3) e placebo (0,71 mg/dL \pm 0,13 na Av0, 0,59 mg/dL \pm 0,15 na Av1, 0,70 mg/dL \pm 0,11 na Av2 e 0,69 mg/dL \pm 0,14 na Av3).

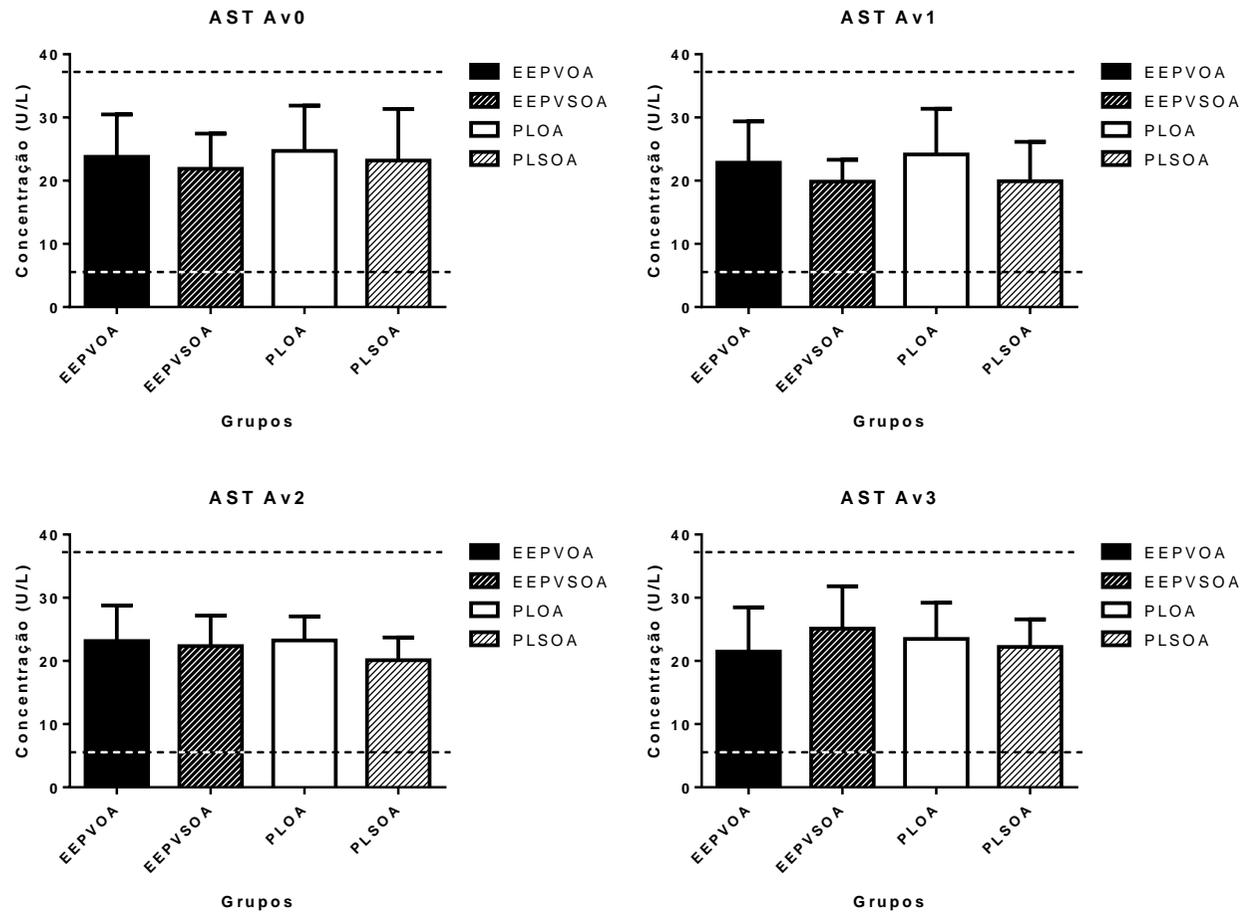
Diante da ausência de toxicidade hepática e renal, visto através das concentrações séricas de AST (Figura 17), ALT (Figura 18), Ureia (Figura 19) e Creatinina (Figura 20), após uso de EEPV em indivíduos com e sem OA, procedemos a análise desses quatro parâmetros em indivíduos com OA em comparação com indivíduos sem OA. Também não foram observadas alterações significativas indicando não haver diferença nos níveis séricos entre os grupos com diferença clínica, além do uso do EEPV por 28 dias não ter apresentado comportamento tóxico com os grupos com e sem OA individualmente.

Figura 16: Dosagens dos níveis séricos de AST, ALT, Ureia e Creatinina dos indivíduos com diagnóstico clínico de Osteoartrose



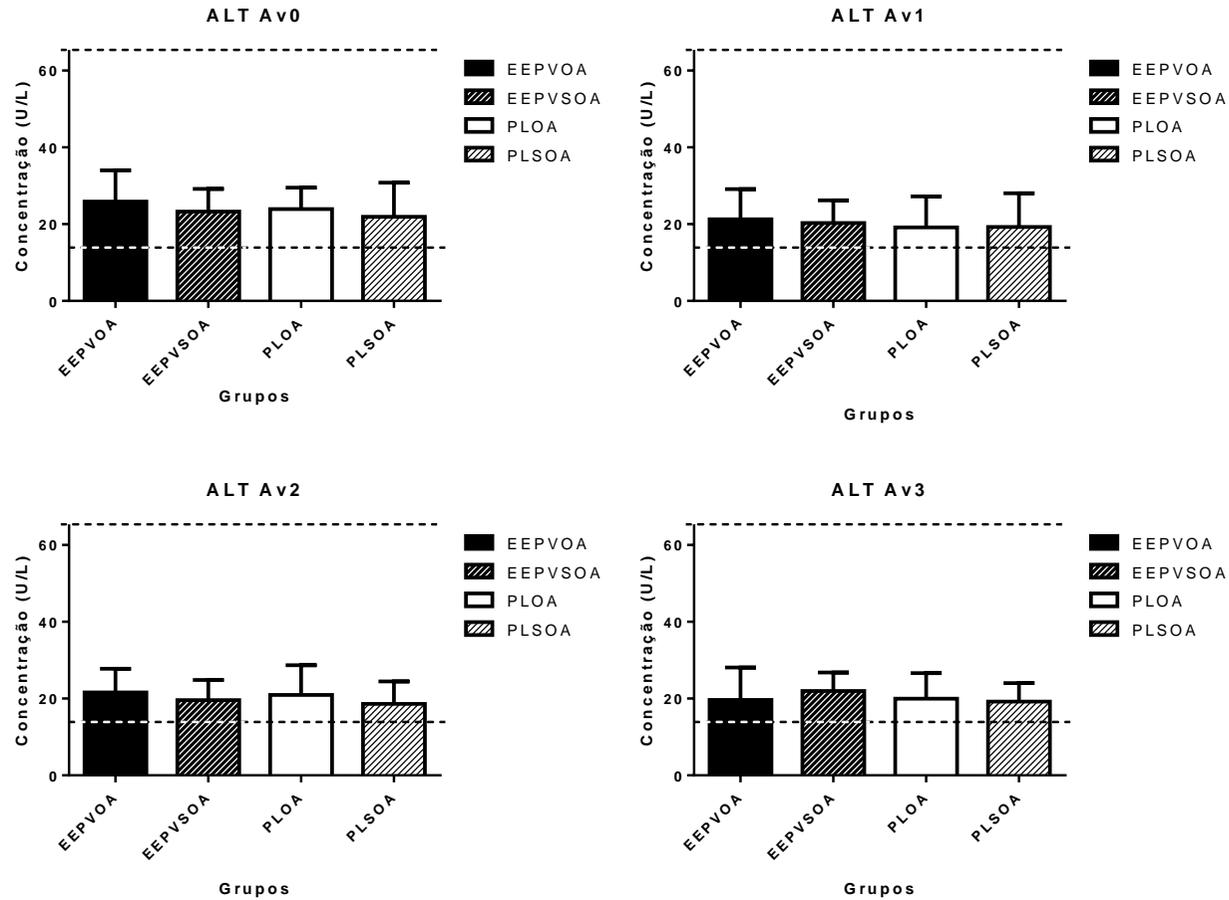
As linhas tracejadas indicam os valores de referência adotados

Figura 17 – Comparação entre os níveis séricos de AST nos indivíduos com e sem osteoartrose que utilizaram própolis ou solução placebo



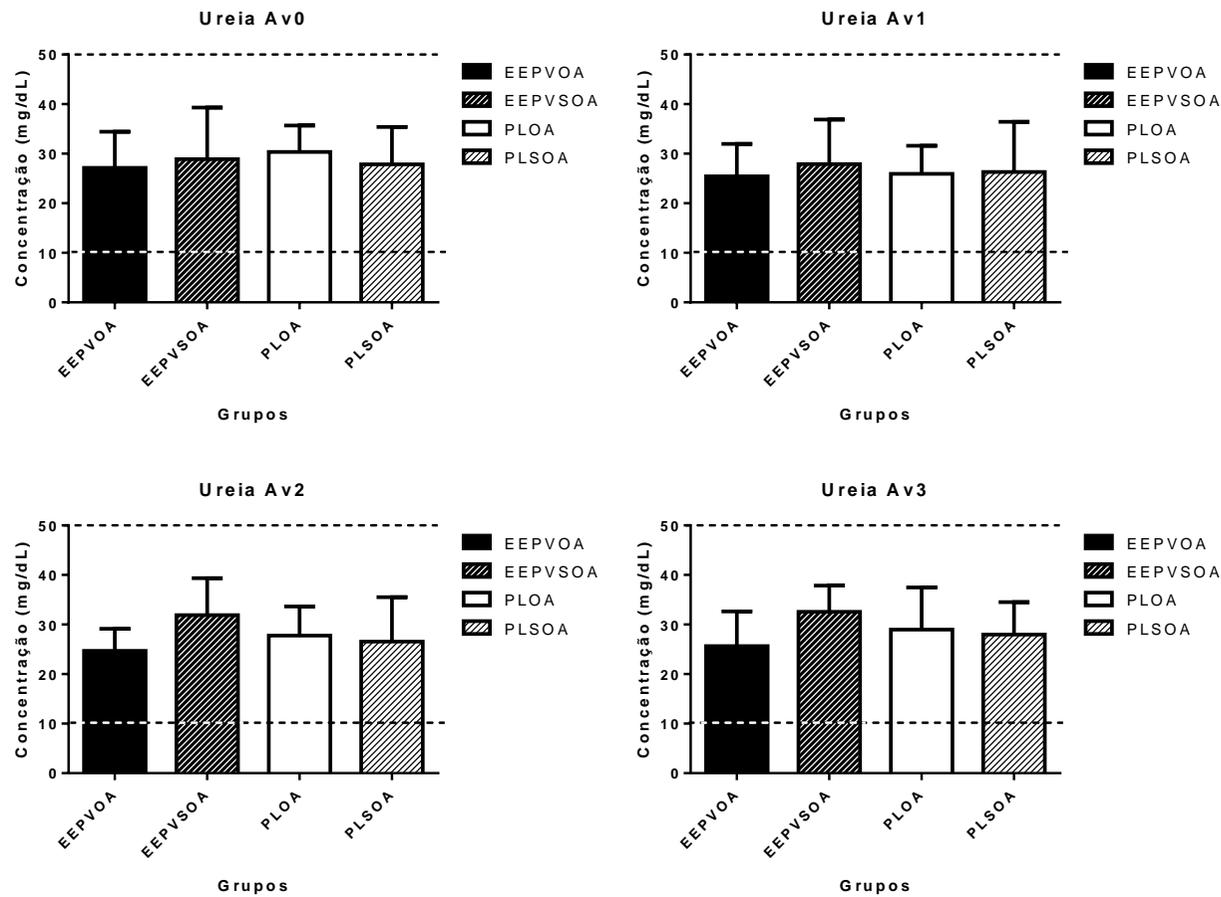
EEPVOA – Grupo com diagnóstico de OA e que recebeu EEPV; PLOA - Grupo com diagnóstico de OA e que recebeu placebo; EEPVSOA - Grupo sem diagnóstico de OA e que recebeu EEPV; PLSOA - Grupo sem diagnóstico de OA e que recebeu placebo. As linhas tracejadas indicam os valores de referência adotados.

Figura 18 Comparação entre os níveis séricos de ALT nos indivíduos com e sem osteoartrose que utilizaram própolis ou solução placebo



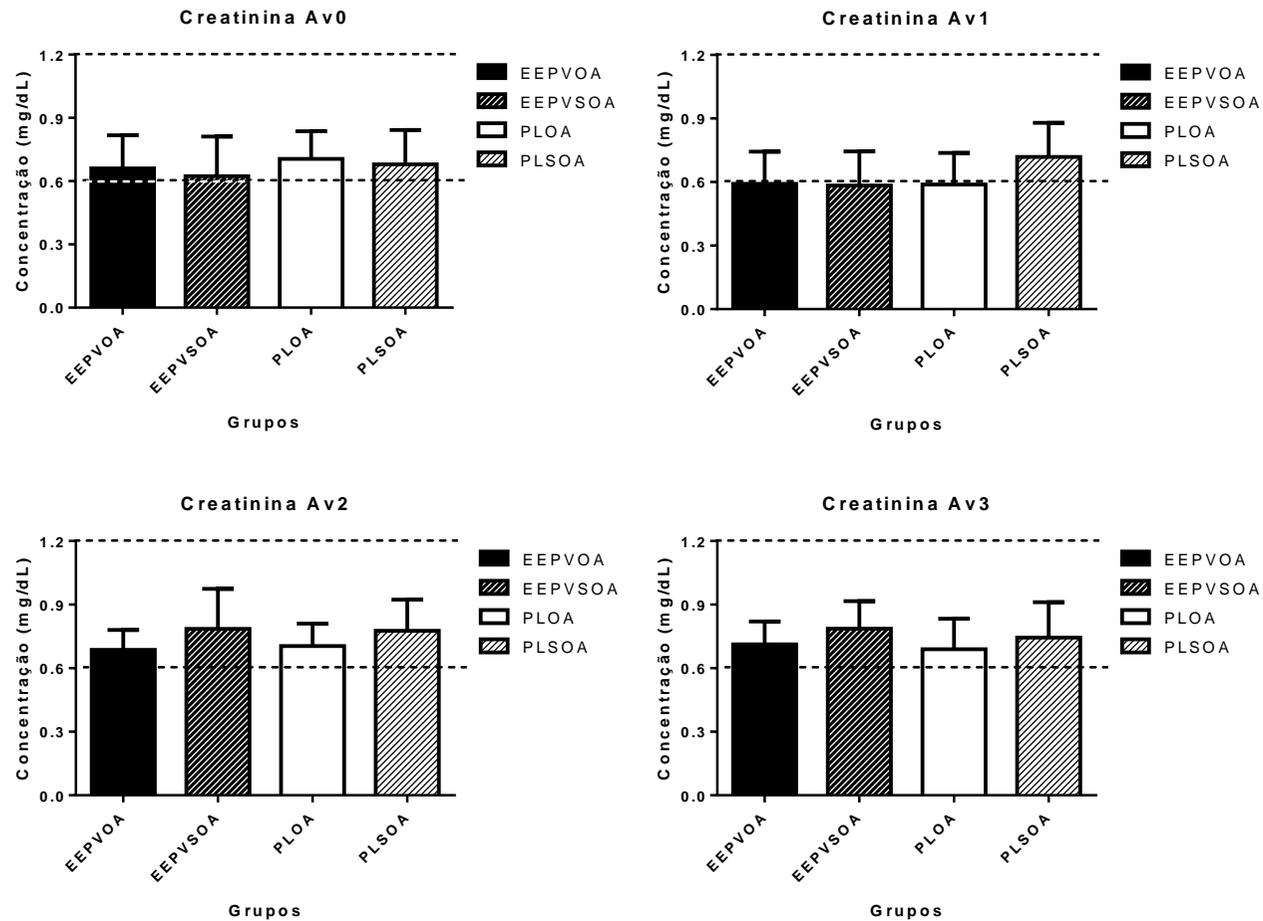
EEPVOA – Grupo com diagnóstico de OA e que recebeu EEPV; PLOA - Grupo com diagnóstico de OA e que recebeu placebo; EEPVSOA - Grupo sem diagnóstico de OA e que recebeu EEPV; PLSOA - Grupo sem diagnóstico de OA e que recebeu placebo. As linhas tracejadas indicam os valores de referência adotados.

Figura 19 Comparação entre os níveis séricos de Ureia nos indivíduos com e sem osteoartrose que utilizaram própolis ou solução placebo



EEPVOA – Grupo com diagnóstico de OA e que recebeu EEPV; PLOA - Grupo com diagnóstico de OA e que recebeu placebo; EEPVSOA - Grupo sem diagnóstico de OA e que recebeu EEPV; PLSOA - Grupo sem diagnóstico de OA e que recebeu placebo. As linhas tracejadas indicam os valores de referência adotados.

Figura 20 Comparação entre os níveis séricos de Creatinina nos indivíduos com e sem osteoartrose que utilizaram própolis ou solução placebo



EEPVOA – Grupo com diagnóstico de OA e que recebeu EEPV; PLOA - Grupo com diagnóstico de OA e que recebeu placebo; EEPVSOA - Grupo sem diagnóstico de OA e que recebeu EEPV; PLSOA - Grupo sem diagnóstico de OA e que recebeu placebo. As linhas tracejadas indicam os valores de referência adotados.

Assim, a ingestão da própolis não foi capaz de interferir na atividade sérica das enzimas de maneira que se pudesse associar sua ingestão a hepatotoxicidade, dado a ausência de elevações bruscas nos resultados de AST e ALT dos voluntários durante o uso da própolis. Os resultados indicam que, apesar terem sido observadas tendências sutis de diminuição dos níveis séricos das enzimas hepáticas juntamente a ingestão da própolis vermelha, na dose administrada e pelo período de uso, não foi possível associar a própolis vermelha a atividades hepatoprotetoras, uma vez que os dados não indicaram diminuições acentuadas na atividade sérica das enzimas.

Porém, quanto a tendência a diminuição dos níveis séricos de AST e ALT, os achados deste estudo corroboram o relato de Morsy et. al. (2016), que em um modelo de estudo em animais, utilizando como cobaias ovelhas da raça Santa Inês, sugestionou uma possível ação hepatoprotetora da própolis vermelha em função das diminuições nas concentrações séricas de transaminases relatadas em seu estudo (MORSY et al., 2016). A não observação de diminuições bruscas nos níveis séricos de transaminases nos voluntários do presente trabalho não descarta a possível ação hepatoprotetora da própolis vermelha, uma vez que, com base nos critérios de exclusão estabelecidos e na ausência de voluntários com indicação de doenças hepáticas, dado a prevalência de resultados de AST e ALT dentro dos valores de referência, apenas indivíduos saudáveis quanto a esses perfis foram avaliados e por um espaço curto de tempo.

Contudo um trabalho desenvolvido por Vega et. al. (2014), analisou a ação da própolis vermelha nessas condições experimentais, buscou identificar modificações hepáticas e possíveis efeitos adversos em pacientes com esteatose hepática não alcoólica, tratados diariamente ao longo de um ano com 12 mL de extrato hidroalcoólico de própolis vermelha por via oral, utilizando uma amostra composta por 40 indivíduos. Os autores relataram que houve diminuições consideráveis nos valores médios de ALT, a cada trimestre nos pacientes tratados com a própolis. Essas reduções consideradas significativas em relação ao grupo controle, resultados semelhantes foram obtidos para as dosagens de AST .

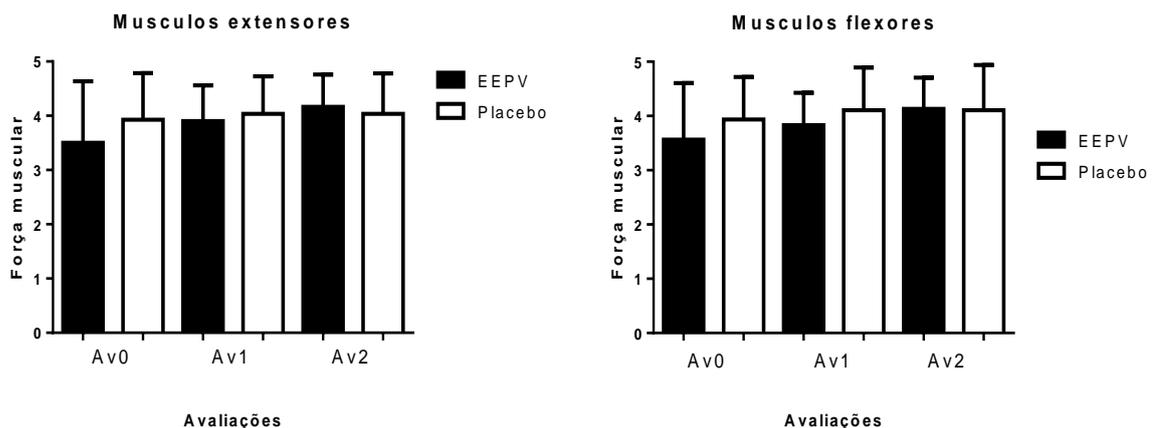
Também é possível observar que não houve alteração significativa nos níveis de ureia e creatinina indicando ausência de efeitos tóxicos renais após utilização de EEPV por 28 dias em indivíduos com ou sem diagnóstico de OA. Comumente UR e CR são utilizadas em conjunto na identificação de lesão renal aguda. Ambas são importantes marcadores de função renal, visto que a creatinina possui excreção

renal exclusivamente seus níveis sanguíneos conseguem refletir a taxa de filtração glomerular e a ureia, apesar de também ser secretada pelo suor e intestino, é majoritariamente de excreção renal (SRISAWAT; KELLUM, 2020).

4.8 - Força muscular

Nossos dados não mostram melhora da força muscular, após 28 dias de utilização do EEPV (Figura 21). Não há indícios de melhora da força muscular após uso de EEPV. A força muscular ocorre e se desenvolve a partir de uma combinação de fatores que incluem sincronização da ativação das unidades motoras e capacidade de recrutamento destas além da integridade neuromuscular (SUCHOMEL et al., 2018).

Figura. 21 – Avaliação da força muscular pela escala de Lovett.

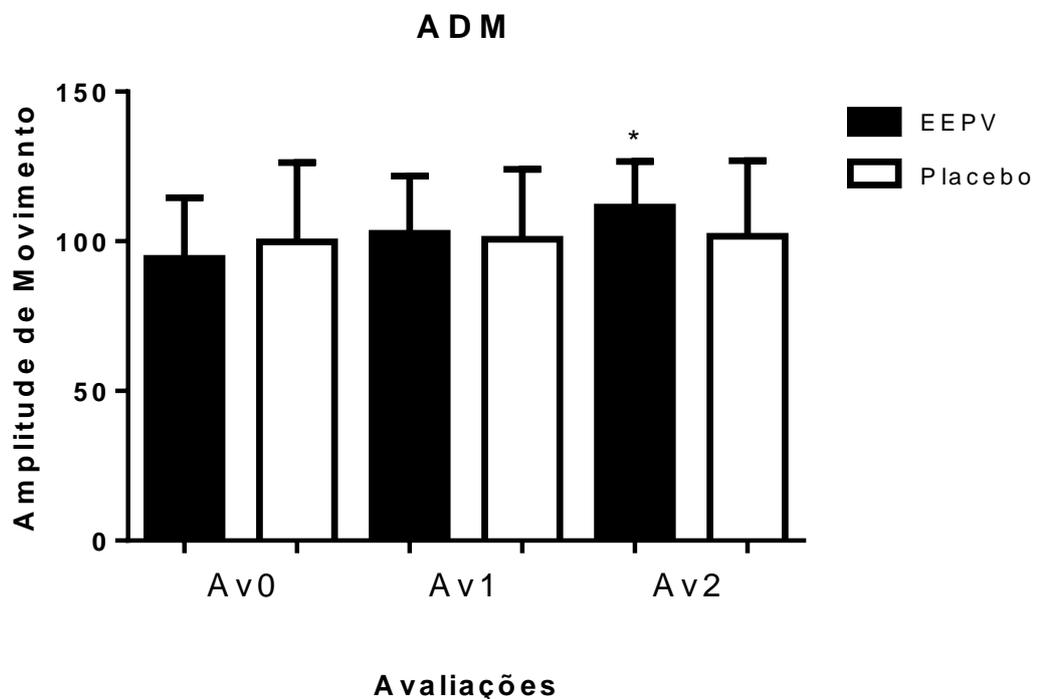


Acredita-se que, apesar da melhora da intensidade da dor e da amplitude de movimento, os participantes apresentavam um déficit neuromuscular importante devido a uma possível redução do uso funcional da articulação, no sentido de evitar piora do quadro. Dados na literatura apontam que indivíduos portadores de OA, tendem a apresentar quadro de aparente fraqueza muscular, podendo estar acompanhada de alteração neuromuscular (BIGHAM et al., 2018). É possível ainda que a metodologia utilizada não tenha sido capaz de perceber mudanças ocorridas, pela sua gradação.

4.9 - Aumento da amplitude de movimento.

Após 28 dias de acompanhamento, o grupo que utilizou o EEPV teve aumento significativo da amplitude de movimento da articulação do joelho ($94,33^{\circ} \pm 20,29$ na Av0, $102,66^{\circ} \pm 19,10$ na Av1 e $111,4^{\circ} \pm 15,24$ na Av2* - * $p < 0,05$) (Figura 22). O aumento da amplitude de movimento representa uma maior independência ao indivíduo que possui osteoartrose, pois quanto maior o arco de movimento, maior a capacidade de realizar atividades funcionais (LATZ et al., 2019). Acreditamos que a melhora da amplitude de movimento, seja consequência da redução do processo inflamatório articular. O processo inflamatório gera sinais clínicos bem estabelecidos, dentre os quais é possível citar a redução na função. Assim, a presença de inflamação articular, leva a restrição de movimento, objetivamente avaliada neste estudo pela amplitude de movimento articular ativa.

Figura 22 - Amplitude de movimento. O grupo que utilizou o EEPV apresentou aumento da amplitude de movimento (* $p < 0,05$) medido pela técnica de goniometria.



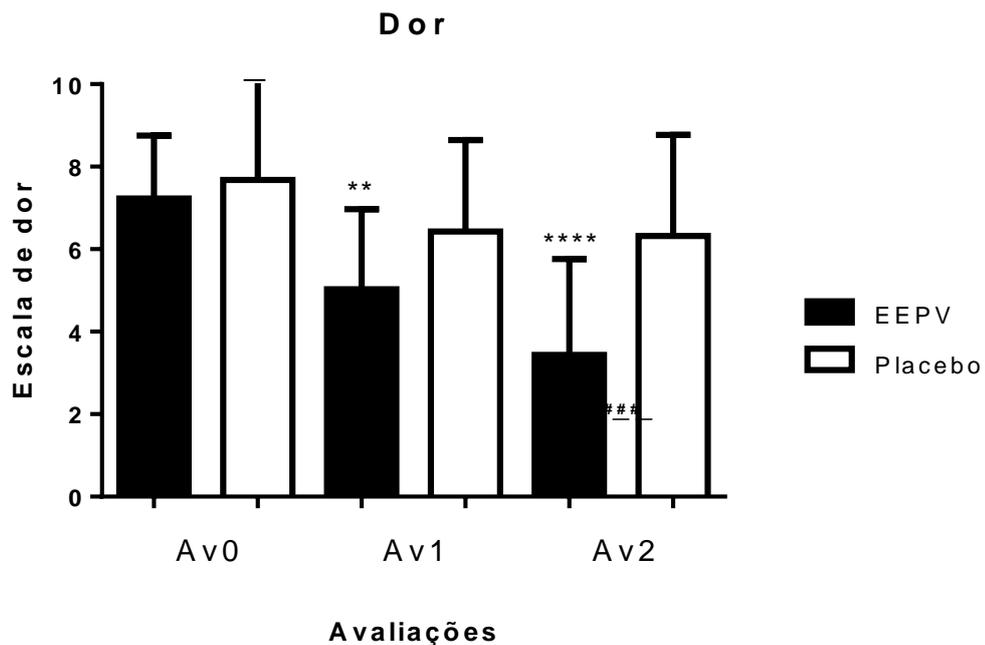
Nosso estudo não evidenciou melhora na força muscular, mas a melhora da ADM pode ser explicada pelo efeito restritivo do edema local característico do

processo inflamatório, ou pela redução da dor e da presença de dor ao movimento no grupo que utilizou o EEPV. A presença de dor, gera um característico efeito de proteção articular, num ciclo que leva a redução da mobilidade. O efeito positivo destes dois componentes da dor articular, parece ser uma explicação plausível para o aumento da ADM.

4.10 - Dor

No momento inicial não havia diferença estatística significativa entre os grupos. Após 14 dias de acompanhamento os dois grupos apresentaram diminuição da intensidade da dor pela Escala de Avaliação Numérica da dor (Figura 23), porém apenas no grupo que utilizou o EEPV (7,23±1,52 na Av0, 5,03±1,9 na Av1 e 3,43±2,33 na Av2) essa redução foi significativa ($p<0,005$). No grupo que recebeu o placebo, a intensidade da dor apresentou distrata variação (7,67±2,55 na Av0, 6,43±2,22 na Av1 e 6,32±2,45 na Av2), sem diferença significativa ao longo das avaliações. Ao final do acompanhamento o grupo EEPV apresentou redução significativa da dor ($p<0,0001$), havendo diferença significativa na intensidade da dor entre os dois grupos ($p<0,0005$).

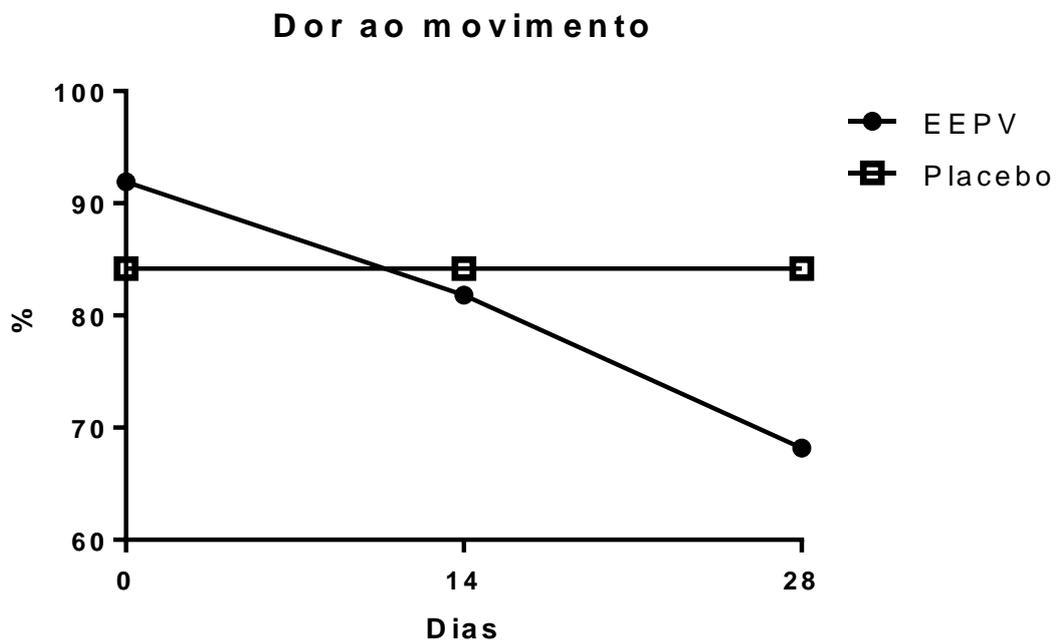
Figura 23 - Intensidade da dor.



** $p<0,005$. **** $p<0,0001$. ### $p<0,0005$. (ANOVA – Dunn's test).

O grupo que utilizou EEPV apresentou redução na intensidade da dor no dia 14 e no dia 28. Ao final do acompanhamento havia diferença significativa entre os índices dos grupos. No grupo submetido ao tratamento placebo, não houve redução no número de participantes que referiram sentir dor ao realizar o movimento de agachamento entre as avaliações inicial e final (Figura 24). Enquanto no grupo que recebeu EEPV, essa redução foi de 26,67% (n=5).

Figura 24 - Dor ao realizar o movimento de agachamento.



Autores referem que a dor se apresenta como sintoma mais incapacitante na OA (HUNTER; BIERMA-ZEINSTR, 2019). Estes mesmos autores, em sua revisão, apontam conclusões sobre a presença de dor estar diretamente relacionada com a presença de inflamação articular, sendo a diminuição do processo inflamatório fator primordial para a redução dos escores de intensidade da dor (HUNTER; BIERMA-ZEINSTR, 2019).

O movimento de agachamento gera uma sobrecarga nos tecidos moles articulares disparando estímulos nervosos que se apresentam como quadro de dor e desconforto. Este movimento é uma atividade funcional frequentemente realizada nas Atividades de Vida Diária (AVD). O exercício isolado de agachamento, uni ou bi

podal, simula atividades como sentar e levantar, subir e descer escadas, além de tarefas ocupacionais e esportivas (ZELLER et al., 2003). Dessa forma, a melhora da dor durante a realização do agachamento nos indivíduos com osteoartrose em uso do EEPV parece indicar uma melhora funcional, dirimindo os incômodos causados pela realização de atividades cotidianas simples (WU et al., 2019).

A diminuição da dor apresentada neste estudo, é possivelmente explicada pela ação anti-inflamatória da própolis. A atividade anti-inflamatória ocorre devido a presença de flavonoides que atuam restringindo a produção de leucotrienos e prostaglandinas (ANJUM et al., 2019). Estudos *in vitro* apontam o potencial anti-inflamatório da própolis, e jogam luz nos mecanismos envolvidos. Dados mostram que a própolis induz uma menor produção de mediadores pró-inflamatórios (BUENO-SILVA et al., 2015), há indícios de atividade inibitória na migração de neutrófilos após tratamento com própolis (BUENO-SILVA et al., 2013).

Um ensaio realizado com leucócitos humanos, mostrou que a própolis foi capaz de anular significativamente a produção de interferon gama (MOSSALAYI et al., 2014), um potente ativador da resposta inflamatória e da produção de citocinas pelos macrófagos (HU; CHAKRAVARTY; IVASHKIV, 2008).

Uma revisão sintetiza o mecanismo anti-inflamatório da própolis, afirmando que já está bem documentada sua atividade inibitória no recrutamento de leucócitos, agindo também na inibição de citocinas e migração de neutrófilos (FRANCHIN et al., 2018). Estão disponíveis na literatura, estudos que indicam ainda que a própolis vermelha é capaz de ativar macrófagos, sugerindo seu uso como agente anti-inflamatório (BUENO-SILVA et al., 2015).

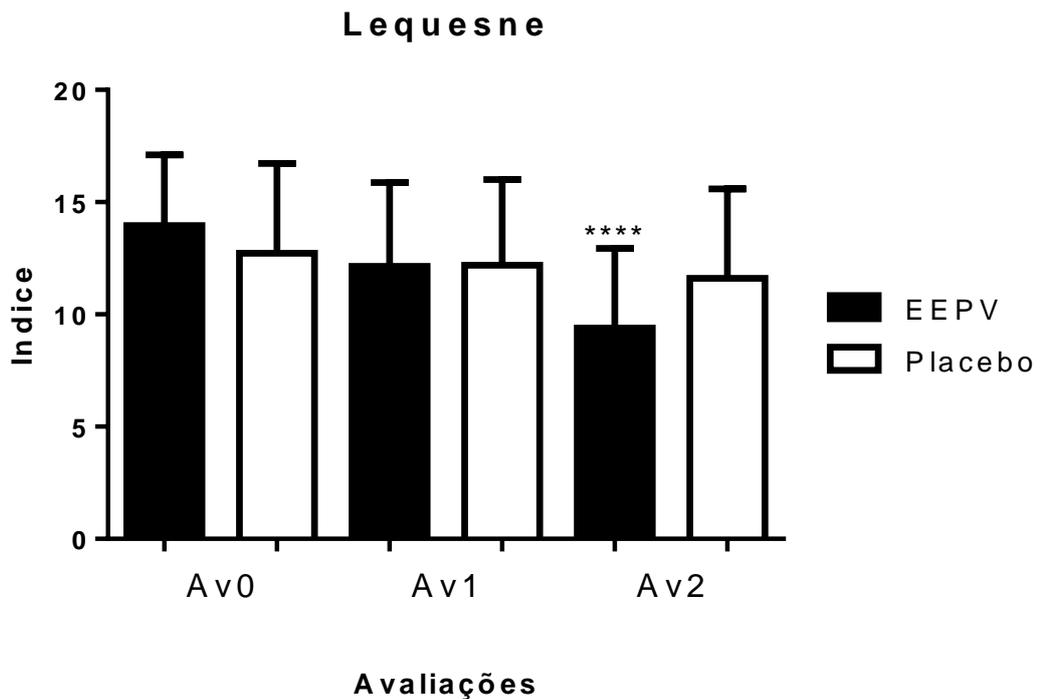
A pinocembrina, flavonoide presente na própolis, inibe mecanismos pró-inflamatórios em condrócitos humanos, com consequente supressão da expressão de algumas metaloproteinases (LI et al., 2017). A própolis também possui galangina, flavonoide com potente atividade antioxidante relatada (ANJUM et al., 2019; BÚFALO et al., 2013). O mecanismo de ação é devido aos compostos fenólicos que atuam eliminando espécies reativas de oxigênio e são capazes de atuar de forma complementar a outros compostos (CHANDNA et al., 2014).

Outros produtos naturais, com atividade anti-inflamatória relatada também apresentaram efeito de redução da dor, quando comparados a um anti-inflamatório não esteroide (SHEP et al., 2019).

4.11 - Melhora da funcionalidade.

Após 4 semanas de uso, houve melhora significativa no questionário funcional de Lequesne (Figura 25), onde os indivíduos do grupo que recebeu o EEPV teve redução dos índices que, na avaliação inicial, apresentavam características de comprometimento extremamente grave para comprometimento grave, com melhora das queixas associadas principalmente ao desconforto noturno (14 pontos para 9,5 pontos) e no placebo os participantes continuaram na classificação de comprometimento muito grave (12,5 pontos para 11,5 pontos).

Figura 25. Funcionalidade. Os dados apontam melhora na função, evidenciada por redução dos escores do questionário funcional de Lequesne



**** $p < 0,0001$. (ANOVA – teste de Dunnett).

Medidas objetivas como dor, força e ADM tem menor resposta placebo e devem ser amplamente utilizadas nas pesquisas com OA. As medidas funcionais também apresentaram menor efeito de resposta placebo do que medidas subjetivas (HUANG et al., 2019). De acordo com as recentes recomendações da sociedade internacional de pesquisa em osteoartrose (OARSI), todos os ensaios clínicos com

indivíduos que possuem OA, devem incluir medidas de função física (SMITH et al., 2019).

A OARSI defende que ensaios clínicos avaliem função física como desfecho de intervenções, utilizando como parâmetros, mobilidade, atividades de vida diária, percepção de fraqueza, avaliação objetiva da força muscular e amplitude de movimento, entre outros (SMITH et al., 2019).

O índice Lequesne consegue contemplar alguns destes aspectos como a capacidade de andar e algumas atividades diárias como subir e descer escadas, sendo a redução do seu índice após utilização do EEPV, um resultado importante que, quando somado a melhora da dor e da amplitude de movimento, indica a eficácia da terapia com EEPV nessa condição clínica.

Mais estudos são necessários para comparar o efeito do EEPV com outros fármacos comerciais em populações maiores, avaliando também a presença de efeitos adversos e segurança de uso.

4.12 - Efeitos adversos

Todos os participantes receberam na avaliação inicial uma ficha para preenchimento de qualquer efeito adverso relacionado ao uso da própolis ou placebo. Todas as avaliações foram precedidas de observação desta ficha. Nenhum participante realizou qualquer registro neste instrumento durante todo o acompanhamento da pesquisa, nos dois grupos.

A ausência de efeitos adversos relatados corrobora com outros estudos realizados com a própolis, onde poucos ou nenhum efeito adverso é relatado, sendo o uso oral considerado seguro (BURDOCK, 1998; DE GROOT, 2013). Porém, na literatura é possível encontrar relatos de reações após uso tópico (DE GROOT, 2013).

5. CONCLUSÃO

A própolis vermelha utilizada neste estudo é proveniente no Município de Japaratinga, Alagoas. A análise química do produto indicou uma origem botânica complementar, evidenciada pela existência de substâncias ainda não descritas em própolis vermelha de outras regiões do estado de Alagoas. Este achado é especialmente importante pela presença de fitoquímicos com atividade antitumoral e antioxidante e que indicam provável origem botânica complementar da própolis vermelha de Japaratinga (Alagoas).

Apesar da existência de novas substâncias na própolis utilizada, a citotoxicidade em macrófagos foi baixa, como já bem descrito para outras amostras. Nossos resultados permitem concluir que a própolis vermelha de Alagoas não possui efeito tóxico *in vitro* e *in vivo*, não alterando significativamente os parâmetros avaliados, exceto nas doses mais altas utilizadas.

Apesar de não ter sido evidenciado efeito protetor nos marcadores de função hepática e renal, a utilização da própolis vermelha via oral, em indivíduos com e sem osteoartrose parece segura, mantendo as concentrações séricas de AST, ALT, Ureia e Creatinina dentro dos valores de normalidade.

Foi possível perceber eficácia terapêutica na melhora da dor, amplitude de movimento e funcionalidade de indivíduos portadores e OA de Joelho, sendo necessários estudos com grupos maiores e que avaliem diferentes concentrações e doses do extrato, além de estudos que comparem o efeito deste com fármacos convencionalmente usados por indivíduos portadores de osteoartrose de Joelho.

6. REFERÊNCIAS

ADEBOLU, T. T. Effect of natural honey on local isolates of diarrhea-causing bacteria in southwestern Nigeria. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 10, p. 1172–1174, 2005.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Vigilância Sanitária - Alimentos, Medicamentos, Produtos e Serviços de Interesse à Saúde - Guia Didático**, 2007. Disponível em: <<http://www.vigilanciasanitaria.sc.gov.br/index.php/download/category/19-publicacoes?download=101:guia-didatico-de-vigilancia-sanitaria-idec-anvisa>>

AIGNER, T. et al. Large-scale gene expression profiling reveals major pathogenetic pathways of cartilage degeneration in osteoarthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 54, n. 11, p. 3533–3544, 2006.

ALLOCCA, M.; ZOLA, S.; BELLOSTA, P. The Fruit Fly, *Drosophila melanogaster*: The Making of a Model (Part I). **Drosophila melanogaster - Model for Recent Advances in Genetics and Therapeutics**, 2018.

ALMEIDA, C. DE F. C. B. R. DE; ALBUQUERQUE, U. P. DE. Uso e conservação de plantas e animais medicinais no Estado de Pernambuco (Nordeste do Brasil): um estudo de caso. **Interciencia**, v. 27, p. 276–285, 2002.

ANAUATE-NETTO, C. et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial on the effects of propolis and chlorhexidine mouthrinses on gingivitis. **Braz Dent Sci**, v. 17, n. 1, p. 11–15, 2014.

ANJUM, S. I. et al. Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 26, n. 7, p. 1695–1703, 2019.

ANVISA. **RDC nº 24, de 14 de Junho de 2010**, 2010.

ASHBURNER, M. **Drosophila: a laboratory handbook**. second edi ed. [s.l: s.n.].

- AYIKOBUA, E. T. et al. Combined Donepezil and Ethanolic Extract of Propolis Improved Memory Better Than Donepezil and Propolis Monotherapy in Wild Type *Drosophila melanogaster*. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2018, 2018.
- BANKOVA, V.; POPOVA, M.; TRUSHEVA, B. The phytochemistry of the honeybee. **Phytochemistry**, v. 155, n. March, p. 1–11, 2018.
- BARRETO, G. et al. Soluble biglycan: A potential mediator of cartilage degradation in osteoarthritis. **Arthritis Research and Therapy**, v. 17, n. 1, p. 1–15, 2015.
- BATISTA, L. H. et al. Avaliação da amplitude articular do joelho: correlação entre as medidas realizadas com o goniometro universal e no dinamômetro isocimético. **Rev Bras Fisioter**, v. 10, n. 2, p. 193–198, 2006.
- BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Bioquímica**. 7 ed ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.
- BIGHAM, H. J. et al. Neuromuscular adaptations in older males and females with knee osteoarthritis during weight-bearing force control. **Knee**, v. 25, n. 1, p. 40–50, 2018.
- BODEKER, G.; KRONENBERG, F. A public health agenda for traditional, complementary, and alternative medicine. **American Journal of Public Health**, v. 92, n. 10, p. 1582–1591, 2002.
- BRASIL. **Portaria nº 702 de 21 de Março de 2018**, 2018.
- BRASIL. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS**. [s.l: s.n.].
- BRASIL. **Portaria nº 702, de 21 de Março de 2018**, 2018.
- BROSSEAU, L. et al. Intra- and intertester reliability and criterion validity of the parallelogram and universal goniometers for measuring maximum active knee flexion and extension of patients with knee restrictions. **Archives of physical medicine and rehabilitation**, v. 82, n. 3, p. 396–402, mar. 2001.
- BRUDZYNSKI, K.; SJAARDA, C. Honey glycoproteins containing antimicrobial peptides, jelleins of the Major Royal Jelly Protein 1, are responsible for the cell wall lytic and bactericidal activities of honey. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, p. 1–21, 2015.
- BRUYÈRE, O. et al. An updated algorithm recommendation for the management of

knee osteoarthritis from the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis, Osteoarthritis and Musculoskeletal Diseases (ESCEO). **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 49, 2019.

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

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

BUENO-SILVA, B. et al. Main pathways of action of Brazilian red propolis on the modulation of neutrophils migration in the inflammatory process. **Phytomedicine**, v. 23, n. 13, p. 1583–1590, 2016.

BUENO-SILVA, B. et al. Brazilian red propolis effects on peritoneal macrophage activity: Nitric oxide, cell viability, pro-inflammatory cytokines and gene expression. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 207, n. June, p. 100–107, 2017.

BÚFALO, M. C. et al. Propolis and its constituent caffeic acid suppress LPS-stimulated pro-inflammatory response by blocking NF- κ B and MAPK activation in macrophages. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 149, n. 1, p. 84–92, 2013.

BURCKHARDT, C. S.; JONES, K. D. Adult measures of pain: The McGill Pain Questionnaire (MPQ), Rheumatoid Arthritis Pain Scale (RAPS), Short-Form McGill Pain Questionnaire (SF-MPQ), Verbal Descriptive Scale (VDS), Visual Analog Scale (VAS), and West Haven-Yale Multidisciplinary Pain Inven. **Arthritis & Rheumatism**, v. 49, n. S5, p. S96–S104, 15 out. 2003.

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

CARDOSO, M. N. et al. Avaliação de atividade mutagênica de amostras de própolis vermelha do Estado de Sergipe (Brasil) pelo Teste de Mutação e Recombinação Somática em *Drosophila melanogaster*. **Scientia Plena**, v. 11, n. 1, p. 1–8, 2015.

CASTALDO, S.; CAPASSO, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, v. 73, p. S1–S6, nov. 2002.

CHANDNA, P. et al. Complementary and Alternative Medicine (CAM): A Review of Propolis in Dentistry. **American Journal of Phytomedicine and Clinical**

Therapeutics, v. 2, n. 6, p. 670–685, 2014.

CHEN, Y. et al. Curcumin supplementation increases survival and lifespan in *Drosophila* under heat stress conditions. **BioFactors**, v. 44, n. 6, p. 577–587, 2018.

CLEVELAND, R. J. et al. The impact of painful knee osteoarthritis on mortality: a community-based cohort study with over 24 years of follow-up. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 27, n. 4, p. 593–602, 2019.

COMPRI-NARDY, M.; STELLA, M. B.; OLIVEIRA, C. **Práticas de laboratório de bioquímica e biofísica: Uma visão integrada**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.

COOPER, C. et al. Occupational activity and osteoarthritis of the knee. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 53, n. 2, p. 90–93, 1994.

CORNARA, L. et al. Therapeutic properties of bioactive compounds from different honeybee products. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, n. JUN, p. 1–20, 2017.

CORRIGAN, M.; HIRSCHFIELD, G. M. Aspects of the Pathophysiology of Primary Biliary Cirrhosis. **Digestive Diseases**, v. 32, n. 2, p. 102–108, 2015.

COSTA-PAZ, M. et al. Knee-related quality of life, functional results and osteoarthritis at a minimum of 20 years' follow-up after anterior cruciate ligament reconstruction. **Knee**, v. 26, n. 3, p. 666–672, 2019.

CROSS, M. et al. The global burden of hip and knee osteoarthritis: Estimates from the Global Burden of Disease 2010 study. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 73, n. 7, p. 1323–1330, 2014.

CUNHA, I. B. S. et al. Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 15, n. 6, p. 964–970, 2004.

CUNNINGHAM-MINNICK, M. J.; PETERS, V. E.; CRIST, T. O. Bee communities and pollination services in adjacent crop fields following flower removal in an invasive forest shrub. **Ecological Applications**, v. 0, n. 0, p. 1–15, 2020.

CUSINATO, D. A. C. et al. Evaluation of potential herbal-drug interactions of a standardized propolis extract (EPP-AF®) using an in vivo cocktail approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 245, n. March, p. 112174, 2019.

CUTHBERT, S.; GOODHEART, G. On the reliability and validity of manual muscle

testing: a literature review. **Chiropractic & Osteopathy**, v. 15, n. 1, p. 4, 2007.

DAHMAN, C. **Drosophila: Methods and Protocols**. [s.l: s.n.].

DANILOV, A. et al. Influence of non-steroidal anti-inflammatory Drosophila melanogaster longevity drugs on Srosophila melanogaster longevity. **Oncotarget**, v. 6, n. 23, 2015.

DAUGSCH, A. et al. Brazilian red propolis - Chemical composition and botanical origin. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, n. 4, p. 435–441, 2008.

DAVID, J. R.; BOCQUET, C. Genetic Tolerance to ethanol in drosophila melanogaster: increade by selection and analysis of correlated responses. **Genetica**, v. 47, n. 1974, p. 43–48, 1977.

DE GROOT, A. C. Propolis: A review of properties, applications, chemical composition, contact allergy, and other adverse effects. **Dermatitis**, v. 24, n. 6, p. 263–282, 2013.

DE MENDONÇA, I. C. G. et al. Brazilian red propolis: Phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 1, p. 1–12, 2015.

DENOBLE, A. E. et al. Uric acid is a danger signal of increasing risk for osteoarthritis through inflammasome activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 5, p. 2088–2093, 2011.

DEQUEKER, J.; LUYTEN, F. P. The history of osteoarthritis-osteoarthrosis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 67, n. 1, p. 5–10, 2008.

DEVEQUI-NUNES, D. et al. Chemical characterization and biological activity of six different extracts of propolis through conventional methods and supercritical extraction. **PLoS ONE**, v. 13, n. 12, p. 1–20, 2018.

DOWNIE, W. W. et al. Studies with pain rating scales. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 37, n. 4, p. 378–381, 1 ago. 1978.

DULAY, G. S.; COOPER, C.; DENNISON, E. M. Knee pain, knee injury, knee osteoarthritis & work. **Best Practice and Research: Clinical Rheumatology**, v. 29, n. 3, p. 454–461, 2015.

EREJUWA, O. O.; SULAIMAN, S. A.; AB WAHAB, M. S. Honey - A novel antidiabetic

- agent. **International Journal of Biological Sciences**, v. 8, n. 6, p. 913–934, 2012.
- FLEURY, M. K. Procedimentos de coleta. In: **Manual de coleta em laboratório clínico**. [s.l.: s.n.].
- FRANCHIN, M. et al. The use of Brazilian propolis for discovery and development of novel anti-inflammatory drugs. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 153, p. 49–55, 2018.
- FRANSEN, M. et al. Glucosamine and chondroitin for knee osteoarthritis: A double-blind randomised placebo-controlled clinical trial evaluating single and combination regimens. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 74, n. 5, p. 851–858, 2015.
- FREIRES, I. A.; DE ALENCAR, S. M.; ROSALEN, P. L. A pharmacological perspective on the use of Brazilian Red Propolis and its isolated compounds against human diseases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 110, p. 267–279, 2016.
- FRESE, E.; BROWN, M.; NORTON, B. Clinical reliability of manual muscle testing middle trapezius and gluteus medius muscles. **Physical Therapy**, p. 1072–1076, 1987.
- GAJDOSIK, R. L.; BOHANNON, R. W. Clinical Measurement of Range of Motion - Review of Goniometry Emphasizing Reliability and Validity. **physical therapy**, v. 67, p. 1867–1872, 1987.
- GALIN, R. R.; AKHTYAMOVA, I. F.; PASTUKHOVA, E. I. Effect of Herbicide Glyphosate on *Drosophila melanogaster* Fertility and Lifespan. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 167, n. 5, p. 663–666, 2019.
- GARZEDIN, D. et al. Pain severity in patients with painful shoulder syndrome. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 16, p. 165–167, 2008.
- GHISALBERTI, E. L. Propolis: A Review. **Bee World**, v. 60, n. 2, p. 59–84, 1979.
- GOBBI, A.; LAD, D.; KARNATZIKOS, G. The effects of repeated intra-articular PRP injections on clinical outcomes of early osteoarthritis of the knee. **Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy**, v. 23, n. 8, p. 2170–2177, 2015.
- GOGIA, P. P. et al. Reliability and Validity of Goniometric - Measurements at the Knee. **physical therapy**, v. 67, p. 192–195, 1987.
- GONCARS, V. et al. Treatment of Knee Osteoarthritis with Bone Marrow–Derived

Mononuclear Cell Injection: 12-Month Follow-up. **Cartilage**, v. 10, n. 1, p. 26–35, 2019.

GROHMANN, J. E. L. Comparison of Two Methods of Goniometry. **physical therapy**, v. 63, p. 922–925, 1983.

HAWKER, G. A et al. Measures of adult pain: Visual Analog Scale for Pain (VAS Pain), Numeric Rating Scale for Pain (NRS Pain), McGill Pain Questionnaire (MPQ), Short-Form McGill Pain Questionnaire (SF-MPQ), Chronic Pain Grade Scale (CPGS), Short Form-36 Bodily Pain Scale (SF. **Arthritis care & research**, v. 63 Suppl 1, n. November, p. S240-52, nov. 2011.

HE, C. et al. Enhanced Longevity by Ibuprofen, Conserved in Multiple Species, Occurs in Yeast through Inhibition of Tryptophan Import. **PLoS Genetics**, v. 10, n. 12, 2014.

HENRIKSEN, M. et al. Evaluation of the benefit of corticosteroid injection before exercise therapy in patients with Osteoarthritis of the knee: A randomized clinical trial. **JAMA Internal Medicine**, v. 175, n. 6, p. 923–930, 2015.

HISLOP, H. J.; MONTGOMERY, J. **Provas de Função Muscular: Técnicas de Exame Manual**. 8ª edição ed. [s.l.] Elsevier Inc, 2008.

HJERMSTAD, M. J. et al. Studies comparing Numerical Rating Scales, Verbal Rating Scales, and Visual Analogue Scales for assessment of pain intensity in adults: a systematic literature review. **Journal of pain and symptom management**, v. 41, n. 6, p. 1073–93, jun. 2011.

HOMANDBERG, G. A.; HUI, F. Association of proteoglycan degradation with catabolic cytokine and stromelysin release from cartilage cultured with fibronectin fragments. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 334, n. 2, p. 325–331, 1996.

HSIA, A. W. et al. Osteophytes and fracture calluses share developmental milestones and are diminished by unloading. **Physiology & behavior**, v. 176, n. 3, p. 139–148, 2019.

HU, X.; CHAKRAVARTY, S. D.; IVASHKIV, L. B. Regulation of interferon and Toll-like receptor signaling during macrophage activation by opposing feedforward and feedback inhibition mechanisms. **Immunological Reviews**, v. 226, n. 1, p. 41–56,

2008.

HUANG, Z. et al. Meta-analysis of pain and function placebo responses in pharmacological osteoarthritis trials. **Arthritis Research and Therapy**, v. 21, n. 1, p. 1–10, 2019.

HUNTER, D. J.; BIERMA-ZEINSTRAS, S. Osteoarthritis. **The Lancet**, v. 393, n. 10182, p. 1745–1759, 2019.

HUSSAIN, R. F.; NOURI, A. M. E.; OLIVER, R. T. D. A new approach for measurement of cytotoxicity using colorimetric assay. **Journal of Immunological Methods**, v. 160, n. 1, p. 89–96, 1993.

HWANG, H. S. et al. Fibronectin fragment-induced expression of matrix metalloproteinases is mediated by MyD88-dependent TLR-2 signaling pathway in human chondrocytes. **Arthritis Research and Therapy**, v. 17, n. 1, p. 1–12, 2015.

INPI. **Denominações de origem reconhecidas**. [s.l: s.n.].

JAGUA-GUALDRÓN, A.; PEÑA-LATORRE, J. A.; FERNANDEZ-BERNAL, R. E. Apitherapy for Osteoarthritis : Perspectives from Basic Research. **Complement Med Res**, n. 59, 2020.

JOVANOVIĆ, B. et al. The effects of a human food additive, titanium dioxide nanoparticles E171, on *Drosophila melanogaster* - a 20 generation dietary exposure experiment. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 2018.

KACURIN, K. A. **Levantamento Inicial dos Recursos Vegetais Usados na APA Costa dos Morais: Município de Japaratinga/AL**. [s.l: s.n.].

KAUN, K. R.; DEVINENI, A. V.; HEBERLEIN, U. *Drosophila melanogaster* as a model to study drug addiction. **Human Genetics**, v. 131, n. 6, p. 959–975, 2012.

KHAN, M. U. et al. Use of complementary and alternative medicine among osteoarthritic patients: A review. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 10, n. 2, p. JE01–JE06, 2016.

KOCOT, J. et al. Antioxidant potential of propolis, bee pollen, and royal jelly: Possible medical application. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, 2018.

KOEPPEL, B. M.; STANTON, B. A. **Renal physiology**. Philadelphia: Elsevier Mosby, 2013.

- KRASSELT, M.; BAERWALD, C. Celecoxib for the treatment of musculoskeletal arthritis. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 20, n. 14, p. 1689–1702, 2019.
- KUBILIENE, L. et al. Comparison of aqueous, polyethylene glycol-aqueous and ethanolic propolis extracts: Antioxidant and mitochondria modulating properties. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 18, n. 1, p. 1–10, 2018.
- LANE, N. E.; SHIDARA, K.; WISE, B. L. Osteoarthritis year in review 2016: clinical. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 25, n. 2, p. 209–215, 2017.
- LATZ, D. et al. Doctor, when can I drive? — Range of motion of the knee while driving a car. **Knee**, v. 26, n. 1, p. 33–39, 2019.
- LAUDY, A. B. M. et al. Efficacy of platelet-rich plasma injections in osteoarthritis of the knee: A systematic review and meta-analysis. **British Journal of Sports Medicine**, v. 49, n. 10, p. 657–672, 2015.
- LEE, M. C. et al. A placebo-controlled randomised trial to assess the effect of TGF- β 1-expressing chondrocytes in patients with arthritis of the knee. **Bone and Joint Journal**, v. 97-B, n. 7, p. 924–932, 2015.
- LEOPOLDINO, A. et al. Paracetamol versus placebo for knee and hip osteoarthritis (Review). **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 2, 2019.
- LI, L. et al. Insights into the Action Mechanisms of Traditional Chinese Medicine in Osteoarthritis. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, 2017.
- LIMA, A. O.; SOARES, J. B.; GRECO, J. B.; GALIZZI, J.; CANÇADO, J. R. **Métodos de laboratório aplicados à clínica: Técnica e interpretação**. 8 ed ed. Ri: Guanabara Koogan, 2010.
- LINFORD, N. J. et al. Measurement of Lifespan in *Drosophila Melanogaster*. **Journal of Visualized Experiments**, n. 71, p. 1–9, 2013.
- LOHMANDER, L. S. et al. Intraarticular sprifermin (recombinant human fibroblast growth factor 18) in knee osteoarthritis: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Arthritis and Rheumatology**, v. 66, n. 7, p. 1820–1831, 2014.
- LÓPEZ, B. G. C. et al. Phytochemical markers of different types of red propolis. **Food Chemistry**, v. 146, n. September, p. 174–180, 2014.
- MADALENO, F. O. et al. Prevalence of knee osteoarthritis in former athletes: a

- systematic review with meta-analysis. **Brazilian Journal of Physical Therapy**, v. 22, n. 6, p. 437–451, 2018.
- MAJEED, M. H. et al. Pharmacological Treatment of Pain in Osteoarthritis: A Descriptive Review. **Current Rheumatology Reports**, v. 20, n. 12, 2018.
- MANTOVANI, V.; MACCARI, F.; VOLPI, N. Chondroitin Sulfate and Glucosamine as Disease Modifying Anti- Osteoarthritis Drugs (DMOADs). **Current Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 11, p. 1139–1151, 2016.
- MARCUCCI, M. C. et al. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **Journal of ethnopharmacology**, v. 74, p. 105–112, 2001.
- MARCUCCI, M. C.; DE CAMARGO, F. A.; LOPES, C. M. A. Identification of amino acids in Brazilian propolis. **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, v. 51, n. 1–2, p. 11–14, 1996.
- MARKOW, T. A. The secret lives of Drosophila flies. **eLife**, v. 4, n. JUNE, p. 1–9, 2015.
- MARKOW, T. A.; O'GRADY, P. M. **Drosophila: A Guide to Species Identification**. [s.l.] British Library, 2006.
- MARX, F. C. et al. Tradução e validação cultural do questionário algofuncional de Lequesne para osteoartrite de joelhos e quadris para a língua Portuguesa. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 46, n. 4, p. 253–260, 2006.
- MCCLURE, K. D.; FRENCH, R. L.; HEBERLEIN, U. A Drosophila model for fetal alcohol syndrome disorders: role for the insulin pathway. **Disease Models & Mechanisms**, v. 4, n. 3, p. 335–346, 2011.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Técnicas para Coleta de Sangue. **Ministério da Saúde**, p. 53, 2001.
- MIYAGI, M. et al. Efficacy of nerve growth factor antibody in a knee osteoarthritis pain model in mice. **BMC Musculoskeletal Disorders**, v. 18, n. 1, p. 1–8, 2017.
- MÖCKS, J. et al. Dealing with selective dropout in clinical trials. **Pharmaceutical Statistics**, v. 1, n. 2, p. 119–130, 2002.
- MOLAN, P. C. Why honey is effective as a medicine. I. Its use in modern medicine. **Bee World**, v. 80, n. 2, p. 80–92, 1999.

MORITA, H. et al. Effect of royal jelly ingestion for six months on healthy volunteers. **Nutrition Journal**, v. 11, n. 1, p. 1, 2012.

MORSY, A. S. et al. Impact of Brazilian red propolis extract on blood metabolites, milk production, and lamb performance of Santa Inês ewes. **Tropical Animal Health and Production**, v. 48, n. 5, p. 1043–1050, 2016.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

MOSSALAYI, M. D. et al. Grape polyphenols and propolis mixture inhibits inflammatory mediator release from human leukocytes and reduces clinical scores in experimental arthritis. **Phytomedicine**, v. 21, n. 3, p. 290–297, 2014.

MOTTA, V. T. **Bioquímica clínica para laboratório: Princípios e interpretações**. 5 ed ed. Rio de Janeiro: MedBook, 2009.

NIJVELDT, R. J. et al. Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 74, n. 4, p. 418–425, 2001.

O'SULLIVAN, S. B.; SCHIMITZ, T. J. **Fisioterapia - Avaliação e tratamento**. 5ª Edição ed. [s.l.] Editora Manole, 2010.

OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de toxicologia**. 4. ed ed. São Paulo: Atheneu, 2014.

OHTORI, S. et al. Efficacy of direct injection of etanercept into knee joints for pain in moderate and severe knee osteoarthritis. **Yonsei Medical Journal**, v. 56, n. 5, p. 1379–1383, 2015.

PANCHAL, K.; TIWARI, A. K. *Drosophila melanogaster* “a potential model organism” for identification of pharmacological properties of plants/plant-derived components. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 89, p. 1331–1345, 2017.

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M. Preparation of Water and Ethanolic Extracts of Propolis and Evaluation of the Preparations. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 62, n. 11, p. 2230–2232, 1998.

PARVATHI, D.; AMRITHA, A.; PAUL, S. WONDER ANIMAL MODEL FOR GENETIC STUDIES-*Drosophila Melanogaster*—ITS LIFE CYCLE AND BREEDING METHODS—

- A REVIEW. **Sri Ramachandra Journal of Medicine**, v. II, n. 2, p. 33, 2009.
- PASUPULETI, V. R. et al. Honey, Propolis, and Royal Jelly: A Comprehensive Review of Their Biological Actions and Health Benefits. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, 2017.
- PRZYBYŁEK, I.; KARPIŃSKI, T. M. Antibacterial properties of propolis. **Molecules**, v. 24, n. 11, p. 11–13, 2019.
- REGAN, E. et al. Extracellular superoxide dismutase and oxidant damage in osteoarthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 52, n. 11, p. 3479–3491, 2005.
- REGINSTER, J. Y. et al. Role of glucosamine in the treatment for osteoarthritis. **Rheumatology International**, v. 32, n. 10, p. 2959–2967, 2012.
- RINONAPOLI, G.; COACCIOLI, S.; PANELLA, L. Tapentadol in the treatment of osteoarthritis: Pharmacological rationale and clinical evidence. **Journal of Pain Research**, v. 12, p. 1529–1536, 2019.
- ROBINSON, M. M.; ZHANG, X. the World Medicines Situation 2011 Traditional Medicines : Global Situation , Issues and Challenges. **World Health Organization**, n. 3rd Edition, p. 1–14, 2011.
- RODWELL, V. W.; BENDER, D. A.; BOTHAM, K. M.; KENELLY, P. J.; WEIL, P. A. **Bioquímica ilustrada de Harper**. 30. ed. [s.l.] AMGH, 2017.
- ROTHSTEIN, J.; MILLER, P.; ROETTGER, R. Goniometric reliability in a clinical setting elbow and knee measurements. **Physical therapy**, v. 63, n. 10, p. 1611–1615, 1983.
- RUFATTO, L. C. et al. Brazilian red propolis: Chemical composition and antibacterial activity determined using bioguided fractionation. **Microbiological Research**, v. 214, n. February, p. 74–82, 2018.
- RYAN, L. M. et al. ATP-induced chondrocalcinosis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 35, n. 12, p. 1520–1525, 1992.
- SANTOS, L. M. et al. Propolis: Types, composition, biological activities and veterinary product patent prospecting. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2019.
- SCHNITZER, T. J. et al. Efficacy and safety of tanezumab monotherapy or combined with non-steroidal anti-inflammatory drugs in the treatment of knee or hip

osteoarthritis pain. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 74, n. 6, p. 1202–1211, 2015.

SEDGWICK, P. What are the four phases of clinical research trials? **BMJ (Online)**, v. 348, n. June, p. 1–2, 2014.

SFORCIN, J. M. Biological Properties and Therapeutic Applications of Propolis. **Phytotherapy Research**, v. 30, n. 6, p. 894–905, 2016.

SHADKAM, M. N.; MOZAFFARI-KHOSRAVI, H.; MOZAYAN, M. R. A comparison of the effect of honey, dextromethorphan, and diphenhydramine on nightly cough and sleep quality in children and their parents. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 16, n. 7, p. 787–793, 2010.

SHEP, D. et al. Safety and efficacy of curcumin versus diclofenac in knee osteoarthritis: A randomized open-label parallel-arm study. **Trials**, v. 20, n. 1, p. 1–11, 2019.

SHI, Y. et al. A small molecule promotes cartilage extracellular matrix generation and inhibits osteoarthritis development. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, 2019.

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

SIMONE-FINSTROM, M.; SPIVAK, M. Propolis and bee health: The natural history and significance of resin use by honey bees. **Apidologie**, v. 41, n. 3, p. 295–311, 2010.

SMITH, T. O. et al. The OMERACT-OARSI core domain set for measurement in clinical trials of hip and/or knee osteoarthritis. **Journal of Rheumatology**, v. 46, n. 8, p. 981–989, 2019.

SRISAWAT, N.; KELLUM, J. A. The Role of Biomarkers in Acute Kidney Injury. **Critical Care Clinics**, v. 36, n. 1, p. 125–140, 2020.

STRECKER, T. R. et al. The effects of the glucocorticoid, dexamethasone, on the development of the *Drosophila* embryo. **Roux's Archives of Developmental Biology**, v. 204, n. 6, p. 359–368, 1995.

SUCHOMEL, T. J. et al. The Importance of Muscular Strength: Training Considerations. **Sports Medicine**, v. 48, n. 4, p. 765–785, 2018.

- SUH, H. J. et al. Behavioral Changes and Survival in *Drosophila melanogaster*: Effects of Ascorbic Acid, Taurine, and Caffeine. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 40, n. 11, p. 1873–1882, 2017.
- SUN, F. et al. In vivo antioxidative activity of propolis evaluated by the interaction with vitamins C and E and the level of lipid hydroperoxides in rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 5, p. 1462–1465, 2000.
- SZLISZKA, E. et al. Chemical composition and anti-inflammatory effect of ethanolic extract of Brazilian green propolis on activated J774A.1 macrophages. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.
- TAAVONI, S. et al. Effect of Royal Jelly on premenstrual syndrome among Iranian medical sciences students: A randomized, triple-blind, placebo-controlled study. **Complementary Therapies in Medicine**, v. 22, n. 4, p. 601–606, 2014.
- TANG, R. et al. *Lycium barbarum* polysaccharides extend the mean lifespan of *Drosophila melanogaster*. **Food and Function**, v. 10, n. 7, p. 4231–4241, 2019.
- THORLUND, J. B. et al. Opioid use in knee or hip osteoarthritis: a region-wide population-based cohort study. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 27, n. 6, p. 871–877, 2019.
- TURKIEWICZ, A.; KIADALIRI, A. A.; ENGLUND, M. Cause-specific mortality in osteoarthritis of peripheral joints. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 27, n. 6, p. 848–854, 2019.
- VALADARES, B. L. B.; GRAF, U.; SPANÓ, M. A. Inhibitory effects of water extract of propolis on doxorubicin-induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 3, p. 1103–1110, 2008.
- VALADARES, B. L. B.; SPANÓ, M. ANTÔNIO; NEPOMUCENO, J. C. Absence of Genotoxic Effects of a Propolis Water Extract (Wep) in *Drosophila melanogaster* somatic cells. **Biosci. J.**, v. 20, n. 1, p. 123–129, 2004.
- VAN DEN BOSCH, M. H. J. Inflammation in osteoarthritis: is it time to dampen the alarm(in) in this debilitating disease? **Clinical and Experimental Immunology**, v. 195, n. 2, p. 153–166, 2019.
- VAN DER LINDE, K. et al. The FlyBar: Administering Alcohol to Flies. **Journal of Visualized Experiments**, n. 87, p. 1–10, 2014.

VAN DER WEEGEN, W. et al. No Difference Between Intra-Articular Injection of Hyaluronic Acid and Placebo for Mild to Moderate Knee Osteoarthritis: A Randomized, Controlled, Double-Blind Trial. **Journal of Arthroplasty**, v. 30, n. 5, p. 754–757, 2015.

VAROGA, D. et al. Human β -defensin 3 mediates tissue remodeling processes in articular cartilage by increasing levels of metalloproteinases and reducing levels of their endogenous inhibitors. **Arthritis and Rheumatism**, v. 52, n. 6, p. 1736–1745, 2005.

VITALONI, M. et al. Global management of patients with knee osteoarthritis begins with quality of life assessment: A systematic review. **BMC Musculoskeletal Disorders**, v. 20, n. 1, p. 1–12, 2019.

VOS, T. et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990-2016: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **The Lancet**, v. 390, n. 10100, p. 1211–1259, 2017.

WALLACE, I. J. et al. Knee osteoarthritis has doubled in prevalence since the mid-20th century. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 35, p. 9332–9336, 2017.

WANG, C. Complementary and Alternative Medicine and Osteoarthritis. **Int J Integr Med.**, 2013.

WINSTON, M. L. *The Biology of Honey Bee*. p. 276, 2003.

WOOLF, A. D.; PFLEGER, B. Burden of major musculoskeletal conditions. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 81, n. 9, p. 646–656, 2003.

WU, J. Z. et al. Biomechanical modeling of deep squatting: Effects of the interface contact between posterior thigh and shank. **Journal of Biomechanics**, v. 96, p. 109333, 2019.

WU, Q. et al. 2,5-Dimethyl-Celecoxib Extends *Drosophila* Life Span via a Mechanism That Requires Insulin and Target of Rapamycin Signaling. **Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 72, n. 10, p. 1334–1341, 2017.

YANG, L.; SIBBRITT, D.; ADAMS, J. A critical review of complementary and

alternative medicine use among people with arthritis: a focus upon prevalence, cost, user profiles, motivation, decision-making, perceived benefits and communication.

Rheumatology International, v. 37, n. 3, p. 337–351, 2017.

YANG, X. et al. Multigenerational effects of cadmium on the lifespan and fertility of *Drosophila melanogaster*. **Chemosphere**, v. 245, p. 125533, 2020.

YU, S. P.; HUNTER, D. J. Intra-articular therapies for osteoarthritis. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 17, n. 15, p. 2057–2071, 2016.

ZELLER, B. L. et al. Differences in kinematics and electromyographic activity between men and women during the single-legged squat. **American Journal of Sports Medicine**, v. 31, n. 3, p. 449–456, 2003.

ZHU, X. et al. Effectiveness and safety of glucosamine and chondroitin for the treatment of osteoarthritis: A meta-analysis of randomized controlled trials. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, v. 13, n. 1, p. 1–9, 2018.

APÊNDICE A – FICHA DE IDENTIFICAÇÃO

| | | | | |
|---|-------|---------------------------|------|-----------------------------------|
| Identificação: | | Telefone: | | Av0: |
| Av1: | Av2: | Av3: | Av4: | Reav: |
| Sexo: | Raça: | Data de Nascimento: | | Nacionalidade: |
| Escolaridade: (Comp/Incomp) () Nenhuma () E. fundamental () E. Médio () E. superior | | | | Naturalidade: |
| Endereço: | | | | Coinfecções: |
| Forma de acesso à saúde (Plano, particular ou SUS): | | Renda Familiar Total: | | Ocupação: |
| Utiliza o membro afetado para as atividades de trabalho: | | Nº de pessoas na família: | | Carga horária de trabalho: |
| | | Renda per capita: | | Local de trabalho: |
| | | Lado Dominante: | | Tempo de instalação dos sintomas: |
| Massa corporal: | | Peso (Kg): | | IMC: |
| Queixas físicas: | | | | |
| Queixas funcionais: | | | | |
| Posição de dormir: | | | | Tipo da dor: |
| Tratamentos Utilizados até o Momento: | | | | Tempo de tratamento: |
| Uso de outros medicamentos: | | | | |
| Outras informações relevantes: | | | | |

APÊNDICE B – FICHA DE AVALIAÇÃO

| | | |
|----------------|-----------|------|
| Identificação: | Telefone: | Av0: |
| Av1: | Av2: | |

1. História Clínica

Existe algum movimento ou posição que provoca dor?

| Av0 | Av1 | Av2 |
|-----|-----|-----|
| | | |

O joelho "faisla" (Instabilidade no joelho)?

| Av0 | Av1 | Av2 |
|-----|-----|-----|
| | | |

Há rangido ou estalido no joelho?

| Av0 | Av1 | Av2 |
|-----|-----|-----|
| | | |

A articulação está inchada?

| Av0 | Av1 | Av2 |
|-----|-----|-----|
| | | |

A marcha é normal?

| Av0 | Av1 | Av2 |
|-----|-----|-----|
| | | |

2. EVA

Sem Dor

| | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|
| 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|

 Dor Máxima

| Av0 | Av1 | Av2 |
|-----|-----|-----|
| | | |

3. Local de dor (A – Anterior // P – Posterior // M – Medial // L – Lateral // 8 – Sem Dor)

| Av0 | Av1 | Av2 |
|-----|-----|-----|
| | | |

4. Goniometria ativa – EXTENSÃO DE JOELHO

| Av0 | | Av1 | | Av2 | |
|-----|---|-----|---|-----|---|
| D | E | D | E | D | E |
| | | | | | |

5. Força muscular

FLEXORA

| | Av0 | | Av1 | | Av2 | |
|---|-----|---|-----|---|-----|---|
| | F | E | F | E | F | E |
| D | | | | | | |
| E | | | | | | |

APÊNDICE D – QUESTIONÁRIO FUNCIONAL DE LEQUESNE

| | | |
|----------------|-----------|------|
| Identificação: | Telefone: | |
| Av0: | Av1: | Av2: |

| QUESTIONARIO LEQUESNE | | | | |
|---|--|-----|-----|-----|
| | | Av0 | Av1 | Av2 |
| Dor ou Desconforto- | Durante o descanso noturno: | | | |
| | - Nenhum ou insignificante 0 | | | |
| | - Somente em movimento ou em certas posições 1 | | | |
| | - Mesmo sem movimento 2 | | | |
| | rigidez matinal ou dor que diminui após se levantar | | | |
| | - 1 minuto ou menos 0 | | | |
| | - Mais de 1 minuto, porém menos de 15 minutos 1 | | | |
| | - Mais 15 minutos 2 | | | |
| | * depois de andar por 30 minutos 0 - 1 | | | |
| | enquanto anda | | | |
| | - Nenhuma 0 | | | |
| | somente depois de andar alguma distância 1 | | | |
| | - Logo depois de começar a andar e aumenta se continuar a andar 2 | | | |
| | - Depois de começar a andar, não aumentando 1 | | | |
| | * enquanto se levanta da cadeira, sem ajuda dos braços (somente se joelho) 0 - 1 | | | |
| Máxima distância caminhada/andada (pode caminhar com dor): | | | | |
| | - Sem limite 0 | | | |
| | - Mais de 1 km, porém com alguma dificuldade 1 | | | |
| | - Aproximadamente 1 km (em + ou - 15 minutos) 2 | | | |
| | - De 500 a 900 metros (aproximadamente 8 a 15 minutos) 3 | | | |
| | - De 300 a 500 metros 4 | | | |
| | - De 100 a 300 metros 5 | | | |
| | - Menos de 100 metros 6 | | | |
| | - Com uma bengala ou muleta 1 | | | |
| | - Com 2 muletas ou 2 bengalas 2 | | | |
| *Sem dificuldade: 0 // Com pouca dificuldade: 0,5 // Com dificuldade: 1 // Com muita dificuldade: 1,5 // Incapaz: 2 | | | | |
| Atividades do dia-a-dia | - Consegue subir um andar de escadas 0 - 2* | | | |
| | - Consegue descer um andar de escadas 0 - 2* | | | |
| | - Agachar-se ou ajoelhar-se 0 - 2* | | | |
| | - Consegue andar em chão irregular / esburacado 0 - 2* | | | |
| TOTAL: | | | | |

APÊNDICE E – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM ESTUDO CLÍNICO

TÍTULO: ANÁLISE DO EFEITO TERAPÊUTICO DA PRÓPOLIS EM PACIENTES COM DORES ARTICULARES

INVESTIGADORES:

Prof. Dra. Magna Suzana Alexandre Moreira

Prof. Dra. Flávia de Barros Prado Moura

Fisioterapeuta Ms. Camila de Barros Prado Moura Sales

Farmacêutico Ms. Fábio Pacheco Pereira da Costa

Farmacêutico Ms. Max Denisson Mauricio Viana

Nutricionista Ms. Geovana Santos Neiva

Eu, _____, tendo sido convidado(a) a participar como voluntário(a) do estudo eficácia terapêutica da própolis no tratamento de sinais e sintomas de reumatismo, recebi da Sra. Profa. Dra. Magna Suzana Alexandre Moreira e da Ms. Camila de Barros Prado Moura Sales, do Doutorado em ciências da saúde da Universidade Federal de Alagoas, responsável por sua execução, as seguintes informações que me fizeram entender sem dificuldades e sem dúvidas os seguintes aspectos:

1. Que o estudo se destina a determinar a eficácia terapêutica da própolis no tratamento de sinais e sintomas articulares, analisando também os aspectos epidemiológicos e nutricionais dos indivíduos participantes
2. Que a importância deste estudo é a de ofertar maior conhecimento científico sobre os efeitos do, já amplamente utilizado, extrato de própolis.
3. Que para a realização deste estudo os pesquisadores irão fazer perguntas sobre alimentação, condições socioeconômicas e de saúde, além de pesar, medir;
4. Durante a pesquisa, serão solicitadas as coletas de sangue venosos, para realização de exames de sangue completos, medições dos níveis de lipídeos e de açúcar no sangue, medições para avaliar as funções renais, hepáticas e cardíacas, medições para detectar possíveis estados anêmicos ou outras doenças, através do hemograma e da análises bioquímicas da coagulação e hemostasia sanguínea. Os exames laboratoriais são muito importantes, por que são sinais precoces de risco de doenças crônicas.
5. Receberei durante as consultas todos os resultados dos exames laboratoriais feitos na pesquisa, de forma totalmente gratuita, recebendo a oportunidade de conhecer a minha situação em relação a saúde geral e as necessidades de prevenção e/ou tratamento. Se notado algum problema, irei ser encaminhado a um serviço de saúde pela própria equipe da pesquisa.
6. O exame de sangue será realizado por Laboratório do Hospital Universitário de Alagoas Prof. Alberto Antunes HUPAA-UFAL. O exame será realizado nos ambulatórios de fisioterapia conveniados ao SUS. A pessoa que coletará o meu sangue trabalha no laboratório e é habilitada a utilizar os procedimentos adequados para não haver riscos. Entretanto, foi esclarecido que há a possibilidade de ocorrer riscos e desconfortos relacionados à coleta venosa, ainda que raros e passageiros, como dor localizada, hematoma, desmaio e infecção. Para a realização dos exames laboratoriais, também dou meu consentimento.
7. Minha participação será mantida em completo sigilo. Todas as informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e serão usadas somente com fins estatísticos. Apenas a coordenação da pesquisa terá acesso a essas informações. As informações vão ser coletadas, diretamente, em pequenos computadores de mão pertencentes aos pesquisadores principais.

- Seu nome, endereço e outras informações pessoais serão transformados em um código de identificação único. As informações coletadas na entrevista ou nas amostras de sangue serão identificadas apenas através do código, sem nenhuma identificação pessoal. Os meus dados pessoais, como nome e endereço, serão usados, apenas, para o agendamento e envio dos resultados dos exames laboratoriais, se houver meu consentimento. Apenas a coordenação da pesquisa terá acesso a essas informações
8. Autorizo ainda, para armazenar a minhas amostras de sangue para estudos posteriores do Grupo de Pesquisa em Imunofarmacologia da Universidade Federal de Alagoas -UFAL. No processo de armazenamento, os meus dados de identificação serão eliminados e substituídos por um código, ou seja, a amostra de sangue será armazenada de forma desvinculada dos meus dados pessoais.
 9. Que os resultados que se desejam alcançar são os seguintes: Diminuição ou ausência de sinais e sintomas articulares.
 10. Que o estudo será feito da seguinte maneira: inicialmente será realizada uma avaliação com observação da intensidade da dor na articulação acometida, e da incapacidade funcional associada à dor, após essa avaliação e observação clínica, será entregue a mim um frasco contendo um xarope que deverá ser tomado por via oral, uma vez por dia, na dose de 75mg de própolis por dia, conforme orientação, durante um período de 30 dias. Após este período serei avaliado semanalmente por um período de 6 meses, em avaliações previamente acordadas entre mim e os pesquisadores.
 11. Que eu participarei das seguintes etapas: avaliação inicial, utilização do extrato, conforme orientado, durante 30 dias, novas avaliações que serão marcadas com antecedência mínima de 48h e preenchimento das fichas e questionários que forem entregues pelas pesquisadoras.
 12. Que os incômodos que poderei sentir com a minha participação são os seguintes: Gosto forte do extrato em uso; constrangimento por estar sendo observado; uso de roupas justas para que as medidas sejam avaliadas com precisão e sem interferência externa; danos relacionados a lembrança do processo de doença ou o que a mesma tenha causado. Os riscos decorrentes da minha participação decorrem das contraindicações ao uso do álcool, base da composição da solução oral, e alergia ao produto, para minimizar esses efeitos eu serei avaliado amplamente e questionado sobre todos os critérios que possam acarretar risco, também serei submetido a várias análises laboratoriais afim de garantir a segurança do uso. Caso algum efeito seja observado devo procurar um serviço de emergência imediatamente e entrar em contato com a pesquisadora principal, pelos telefones ofertados, para as devidas providências assistenciais.
 13. Que eu serei indenizado por qualquer dano que venha a sofrer com a participação na pesquisa podendo contar com a assistência dos hospitais vinculados à UFAL.
 14. Que os benefícios que deverei esperar com a minha participação, mesmo que não diretamente são: possível melhora dos sinais e sintomas causados pela dor articular de base, menor risco de efeitos colaterais decorrentes do uso da terapia, melhora na minha funcionalidade e qualidade de vida.
Que este estudo contará com grupo placebo, ou seja, um dos grupos não receberá o xarope a base de própolis e sim uma solução alcoólica com corante alimentar, porém tal fato não será de meu conhecimento prévio para fins de garantir confiabilidade do resultado da pesquisa.
 15. Que a minha participação será acompanhada do seguinte modo: no primeiro dia, será entregue o frasco do extrato e eu deverei trazê-lo a todas as avaliações necessárias e marcadas
 16. Que eu serei informado (a) sobre o resultado final desta pesquisa, e sempre que desejar serão fornecidos esclarecimentos sobre cada uma das etapas do estudo.
 17. Caso o uso de própolis seja validado na pesquisa, gerando um medicamento, o acesso a este será garantido aos participantes após a realização da pesquisa por tempo indeterminado. O acesso também será garantido no intervalo entre o término da participação individual e o final do estudo.

18. Que, a qualquer momento, eu poderei recusar a continuar participando do estudo e, também, que eu poderei retirar este meu consentimento, sem que isso me traga qualquer penalidade ou prejuízo.

Pagina2/3

19. Que as informações conseguidas através da minha participação não permitirão a identificação da minha pessoa, exceto à equipe de pesquisa, e que a divulgação das mencionadas informações só será feita entre os profissionais estudiosos do assunto.

20. Que o estudo não acarretará nenhuma despesa para o sujeito da pesquisa.

21. Que eu receberei uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Finalmente, tendo eu compreendido perfeitamente tudo o que me foi informado sobre a minha participação no mencionado estudo e estando consciente dos meus direitos, das minhas responsabilidades, dos riscos e dos benefícios que a minha participação implicam, concordo em dele participar e para isso eu DOU O MEU CONSENTIMENTO SEM QUE PARA ISSO EU TENHA SIDO FORÇADO OU OBRIGADO.

Contato de urgência: Sr(a).
 Domicílio: (rua, praça, conjunto:
 Bloco: /Nº: /Complemento:
 Bairro: /CEP/Cidade: /Telefone:
 Ponto de referência:

Endereço d(os,as) responsável(is) pela pesquisa (OBRIGATÓRIO):
 Instituição: Universidade Federal de Alagoas
 Endereço: Campus A. C. Simões.
 Bloco: /Nº: /Complemento: Bloco do ICBS
 Bairro: /CEP/Cidade: Cidade Universitária/ Maceió – AL
 Telefones p/contato: (82) 3214-1681

ATENÇÃO: Para informar ocorrências irregulares ou danosas durante a sua participação no estudo, dirija-se ao:
 Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alagoas:
 Prédio da Reitoria, sala do C.O.C. , Campus A. C. Simões, Cidade Universitária
 Telefone: 3214-1041

Maceió, _____ de _____ de _____.

| | |
|---|--|
| | |
| (Assinatura ou impressão datiloscópica d(o,a) voluntári(o,a) ou responsável legal - Rubricar as demais folhas) | Nome e Assinatura do(s) responsável(is) pelo estudo (Rubricar as demais páginas) |

Pagina3/3