UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

DÉBORA PIAI DINIZ

Avaliação do efeito Antioxidante do Extrato
Padronizado de Própolis em voluntários sadios.

Ribeirão Preto
2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

DÉBORA PIAI DINIZ

Avaliação do efeito Antioxidante do Extrato
Padronizado de Própolis em voluntários sadios

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Clínica Médica

Área de Concentração: Clínica Médica

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Barbosa Coelho

Ribeirão Preto

2019

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Diniz, Débora Piai

Avaliação do efeito Antioxidante do Extrato Padronizado de
Própolis em voluntários sadios.

86 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Clínica Médica

Orientador: Coelho, Eduardo Barbosa

1. Própolis. 2. Antioxidantes. 3. Radicais Livres. 4. Estresse oxidativo.
5. Superóxido dismutase.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Débora Piai Diniz

Avaliação do efeito Antioxidante do Extrato Padronizado de Própolis em voluntários sadios. Ribeirão Preto, 2019.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Clínica Médica

Área de concentração: Clínica Médica

Aprovado em:

Banca Examinadora:

Prof(a).Dr(a).

Instituição:

Assinatura:

Prof(a).Dr(a).

Instituição:

Assinatura:

Prof(a).Dr(a).

Instituição:

Assinatura:

AGRADECIMENTOS

À FAEPA e FINEP pelo apoio financeiro para a execução do projeto. Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

A empresa Apis-Flora pelo fornecimento do extrato padronizado de própolis (EPP-AF®), pelo capital disponibilizado para execução do projeto e pela concessão de bolsas aos participantes e à Prof. Dra. Andresa Aparecida Berretta, pela expertise no desenvolvimento farmacêutico e dedicação aos estudos preliminares realizados.

Ao meu orientador Prof. Dr. Eduardo Barbosa Coelho, por todo conhecimento compartilhado, dedicação, por estar sempre disponível quando necessário e orientar com maestria e paciência.

Ao Prof. Dr. Alceu Jordão por disponibilizar o Laboratório de Nutrição da FMRP para desenvolvimento das análises e à técnica de laboratório Paula Payão pelo auxílio e execução das análises.

À Daniela Lorencini por sempre me socorrer em momentos de apuros.

À Equipe da Unidade de Pesquisa Clínica e todos os voluntários que forneceram material para seguimento das análises.

À minha família, amigos e ao meu amor por estarem sempre por perto estendendo a mão para o que fosse necessário.

RESUMO

DINIZ, Débora Piai. **Avaliação do efeito Antioxidante do Extrato Padronizado de Própolis em voluntários sadios**. 2019. 72f. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

A própolis é rica em polifenóis, em especial flavonoides e ácidos fenólicos e apresenta atividade antioxidante expressiva, demonstrada principalmente por estudos *in vitro*. O objetivo desse estudo foi o de avaliar a eficácia antioxidante de um extrato padronizado de própolis (EPP-AF®) em uso oral em voluntários sadios. 34 participantes sadios (67,7% mulheres, idade 30 ± 8 anos, 97% brancos) receberam EPP-AF® em duas doses orais sequenciais (375 e 750 mg/d, V.O, três tomadas) por 7 ± 2 d, iniciando com a menor dose. Imediatamente antes de se iniciar a administração de EPP-AF® e ao final de cada dose, amostras de sangue e urina foram coletadas para quantificação de GSH (glutathiona reduzida), GSSH (glutathiona oxidada), SOD (superóxido dismutase), FRAP (capacidade de redução do ferro), vitamina E, MDA (malondialdeído), em plasma e 8 hidroxideoxiguanosina (8-OHDG) e 8-isoprostanos (8-iso) em urina. Houve redução da peroxidação lipídica com as duas doses de EPP-AF®, comparados ao período basal (8-iso, ng/mg de creatinina 1,1 [0,9 – 1,3] vs. 0,85 [0,75 – 0,95] e 0,89 [0,74 – 1,0], $P < 0,05$, para doses de 375 e 750 mg/d vs. basal, média e IC95%, respectivamente) e redução da oxidação de DNA com a dose de 750 mg/d (8-OHDG, 15,7 [13,2 – 18,1] vs. 11,6 [10,2 – 13,0], basal vs. 750 mg/d, ng/mg de creatinina respectivamente, $P < 0,05$). A redução do dano por estresse oxidativo foi acompanhada de elevação da concentração da SOD (1,4 [1,1 - 1,8] vs. 2,5 [1,6 -

3,0] e 2,6 [1,8 -3,3], U/L, $P<0.0001$ para doses de 375 e 750 mg/d vs. basal, mediana e intervalo interquartil 25-75%, respectivamente) e da GSH para a dose de 375mg/d (1,23 [1,06 -1,34] vs. 1,33 [1,06 – 1,47], $\mu\text{mol/L}$, $P<0.05$). Em conclusão, EPP-AF® reduziu dano celular por estresse oxidativo em humanos saudáveis, com aumento da capacidade enzimática antioxidante, principalmente da SOD.

Palavras-chave: própolis, antioxidantes, radicais livres, estresse oxidativo, superóxido dismutase

ABSTRACT

DINIZ, D.P. **Antioxidant effect Evaluation of Standardized Extract of Propolis (EPP-AF®) in healthy volunteers** 2019. 72f. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Propolis is rich in polyphenols, especially flavonoids and phenolic acids and has significant antioxidant activity. showed mainly in “in vitro” studies. The aim of this study was to evaluate the antioxidant efficacy of a standardized propolis extract (EPP-AF®) orally administered to healthy volunteers. 34 healthy participants (67,7% women, 30±8 years-old, 97% White) recieved two EPP-AF® dosis (375 and 750 mg/d, P.O, trid) during 7±2 days, starting by the lower dosis. Immediately before starting EPP-AF® administration and at the end of each dose, blood and urine samples were collected for quantification of GSH (reduced glutathione), GSSH (oxidized glutathione), SOD (superoxide dismutase), FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), vitamin E and MDA (malondialdehyde) in plasma and for 8 hidroxi-deoxy-guanosine (8-OHDG) e 8-isoprostanes (8-iso) in urine. Lipid peroxidation decreased with both doses of EPP-AF® compared to baseline (8-iso, 1.1 [0.9 – 1.3] vs. 0.85 [0.75 – 0.95] e 0.89 [0.74 – 1.0], ng/mg creatinine, P<0.05, for 375 and 750 mg/d EPP-AF® dosis vs. baseline, mean and CI95%, respectively) and reduction of DNA oxidation with 750 mg/d dosis (8-OHDG, 15.7 [13.2 – 18.1] vs. 11.6 [10.2 – 13.0], baseline vs. 750 mg/d, respectively, ng/mg creatinine, P<0.05. Reduction of oxidative stress damage was accompanied by increased SOD concentration (1.4 [1.1 – 1.8] vs. 2.5 [1.6 – 3.0] e 2.6 [1.8 -3.3], U/L, P<0.0001 375 and 750 mg/d vs. baseline, median and interquartil range 25-75%, respectively) and by increased GSH for 375 mg/d EPP-AF® dosis (1.23 [1.06 - 1.34] vs. 1.33 [1.06 – 1.47], µmol/L, P<0.05). In conclusion, EPP-AF® reduced oxidative stress cell damage in healthy humans, with increased antioxidant enzymatic capacity, especially of SOD.

Keywords: propolis, antioxidants, free radicals, oxidative stress, superoxide
dismutase

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS

FIGURAS:

Figura 1 – Fluxograma de recrutamento, seleção e análise do estudo clínico, de acordo com CONSORT.....	31
Figura 2 - Concentração plasmática de FRAP (mmol/L) e vitamina E (µmol/L) antes e após o uso de EPP-AF (375 e 750 mg/d) por 7 dias.....	35
Figura 3 - Concentração plasmática de GSH (mmol/L), GSSG (mmol/L) e razão GSH/GSSG antes e após o uso de EPP-AF (375 e 750 mg/d) por 7 dias.....	37
Figura 4 - Concentração plasmática de SOD (U/L) antes e após o uso de EPP-AF (375 e 750 mg/d) por 7 dias.....	38
Figura 5 - Excreção urinária de 8 – isoprostano ng/mg de creatinina e 8-OHDG ng/mg de creatinina antes e após o uso de EPP-AF (375 e 750 mg/d).....	39
Figura 6 - Concentração plasmática de MDA (µmol/L) e CAT (mmol/L) antes e após o uso de EPP-AF (375 e 750 mg/d) por 7 dias.....	41
Figura 7 - Correlação de Spearman entre a concentração plasmática de SOD (u/L) e a excreção urinária de 8-isoprostanos (ng/mg creatinina).....	42

TABELAS:

Tabela 1 - Características dos participantes incluídos no estudo.....	32
Tabela 2 - Concentração do FRAP e Vitamina E em plasma antes e após uso de 7 dias de EPP-AF (375 e 750 mg/d) em voluntários sadios.....	34
Tabela 3 - Concentração de GSH (mmol/L), GSSG (mmol/L), razão GSH/GSSG e atividade da SOD em plasma antes e após uso de 7 dias de EPP-AF (375 e 750 mg/d) em voluntários sadios.....	36
Tabela 4 - Excreção urinária de 8 - isoprostano ng/mg de creatinina e 8-OHDG ng/mg de creatinina antes e após uso de 7 dias de EPP-AF (375 e 750 mg/d) em voluntários sadios.....	39
Tabela 5 - Danos oxidativos por MDA plasmático µmol/L e capacidade antioxidante total (CAT) em mmol/L.....	40

LISTA DE SIGLAS

DM2	Diabete Mellitus Tipo 2
ATP	Adenosina Trifosfato
GSH	Glutationa Reduzida
GSSG	Glutationa Oxidada
SOD	Superóxido Dismutase
EPP-AF	Extrato Padronizado de Própolis
8-ISSO	8-Isoprostano
8-HDG	8-Oxi-hidro-deoxi-guanosina
Gama GT	Gama Glutamil Transferase
HCFMRP-USP	Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo
HIV	Human Immunodeficiency Virus
CAT	Catalase
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
MDA	Malontodialdeído
REDOX	Reação de Oxirredução
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
RNA	Ácido Ribonucleico
ROS	Reactive oxygen species
TBARS	Thiobarbituric acid reactive substances
TGO	Transaminase Glutâmico-Oxalacética
HDL	High Density Lipoproteins
INPI	Instituto Nacional de Propriedade Industrial

CNS	Conselho Nacional de Saúde
HCG	Hormônio Gonadotrófico
HCL	Ácido Clorídrico
TMP	Tetrametoxipropano
DTNB	Ácido 2-nitrobenzoico
TNB	Tio 2-nitrobenzoico
GS-TNB	Oxidado aduto glutationa-TNB
KPE	Tampão Fosfato de Potássio
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
TPTZ	Tripyrdyl-s-triazine
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Pressão
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. OBJETIVO.....	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1 PROTOCOLO CLÍNICO.....	24
3.2 QUANTIFICAÇÃO DE MDA EM PLASMA.....	25
3.3 QUANTIFICAÇÃO DE GSSG E GSH EM PLASMA POR CINÉTICA...	25
3.4 QUANTIFICAÇÃO DE FRAP (CAPACIDADE DE REDUÇÃO DO FERRO) EM PLASMA	26
3.5 QUANTIFICAÇÃO DE 8-ISOPROSTANO E 8-HIDROXI-DEOXI-GUANOSINA (8-OHDG) NA URINA POR ELISA.....	27
3.6 DOSAGEM DE VITAMINA E EM PLASMA.....	27
3.7 QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE DE SOD (SUPEROXIDO DISMUTASE).....	28
3.8 ANÁLISE DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (CAT).....	28
3.9 ANÁLISE DOS DADOS.....	29
4. RESULTADOS.....	30
4.1 SISTEMAS NÃO ENZIMÁTICOS.....	34
4.2 PROTEÍNAS ANTIOXIDANTES E SISTEMAS ENZIMÁTICOS.....	35
4.3 MARCADORES DE DANO CELULAR.....	38
5. DISCUSSÃO.....	43
6. CONCLUSÃO.....	48
REFERENCIAS.....	50
ANEXOS.....	56
ANEXO A - Ofício ANVISA	57
ANEXO B - Parecer Consubstanciado do CEP.....	59
ANEXO C - Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos.....	62
ANEXO D - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	68
ANEXO E - Artigo.....	73

1. INTRODUÇÃO

O processo de oxirredução que acontece em elementos químicos refere-se as reações de transferência de elétrons. Processos de oxidação são definidos quando há perda de elétrons, com consequente aumento da carga positiva, contrapondo-se aos processos de redução onde há ganho de elétrons e aumento da carga negativa (FERREIRA & MATSUBARA, 1997)

A manutenção da viabilidade das células requer um processo contínuo de produção de energia na forma de adenosina trifosfato (ATP). Este processo é em grande parte realizado por mitocôndrias, organelas intracelulares responsáveis pela geração de energia a partir do oxigênio. Neste processo, espécies reativas de oxigênio são formadas das quais muitas participam do controle da homeostase celular, atuando como mediadores bioquímicos de sinalização intracelular, ativação de receptores próprios ou mesmo controlando a expressão de genes. Em condições de hipóxia, envelhecimento ou dano celular pode haver desacoplamento desta cadeia respiratória, levando à formação de substâncias reativas como aldeídos, malondialdeídos, superóxidos e peróxidos que lesam proteínas, os ácidos nucleicos (DNA/RNA) ou a própria membrana celular (HUSSAIN et al, 2016). Dependendo da natureza do dano, as células podem morrer por processo de necrose ou apoptose ou ainda sofrer mutações que podem desencadear processos neoplásicos (CHANG et al, 2011). Em condições celulares normais há um equilíbrio entre a produção de radicais livres e sua neutralização. No entanto quando esse equilíbrio tende para uma produção excessiva de radicais torna-se prejudicial ao organismo (BARBOSA, 2010). Assim, o excesso de produção de radicais livres de oxigênio, definido como estresse oxidativo, pode levar a lesão celular e participar de uma série de doenças crônico-degenerativas observadas em humanos, como o câncer, as doenças inflamatórias, diabetes melito, aterosclerose, Alzheimer entre outras (FITZMAURICE; LAIRD; WARE 2011; ZHU et al. 2018). O processo de produção de radicais livres é contínuo durante a vida. Assim, as células apresentam defesas antioxidantes que as protegem do dano por estresse oxidativo. Esta linha de defesa é formada por sistemas enzimáticos, como por exemplo, a glutathione peroxidase (GSH), catalase, superóxido dismutase (SOD) (DORNAS, 2008) e por dezenas de substâncias que possuem papel de se ligarem aos radicais livres, os neutralizando. Estas substâncias podem ser endógenas (por exemplo o ácido úrico) ou

ser ofertadas à partir da dieta ou de suplementos (flavonoides, carotenóides, polifenóis, ácido ascórbico, vitamina E, etc.) (PELUSO & SERAFINI, 2016; AHMADINEJAD et. al, 2017HUANG, 2018).

A SOD é a principal enzima responsável por reagir com o radical superóxido, catalisando-o em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio, que por sua vez é decomposto em oxigênio e água pela catalase. (LIU & JIANG, 2012). A catalase é uma enzima essencial no metabolismo do peróxido de hidrogênio. A primeira função atribuída a catalase é a decomposição de H_2O_2 em água mais oxigênio sem a consumação de equivalentes redutores endógenos. Além de sua atividade catalítica dominante, também pode atuar em seu modo de peroxidação, ou seja, decomposição de pequenos substratos, tais como, metanol, hidroperóxidos e, no caso do etanol, oxidá-lo em acetaldeído. (GLORIEUX; CALDERON, 2017). A glutathione compõe outro sistema enzimático antioxidante de relevância, sendo a enzima tiol celular mais abundante. Sua forma oxidada é o dissulfeto de glutathione (GSSG). Como um importante tampão redox celular, os níveis relativos de GSH e GSSG mantêm a homeostase redox celular. A GSH também protege a célula contra toxicidade, elimina o radical hidroxila e superóxido diretamente e serve como cofator para a enzima glutathione peroxidase, no metabolismo do peróxido de hidrogênio e dos lipídios. Além disso, também é capaz de regenerar outros antioxidantes importantes como vitaminas C e E, devolvendo-as a sua forma ativa. Além de seu importante papel como antioxidante a GSH demonstrou participar de outros processos fisiológicos incluindo metabolismo de nucleotídeos, formação de segundos mensageiros lipídicos e modulação da proteína por modificação redox. (CHEN et. al, 2013).

Há um destaque na medicina complementar para os polifenóis, que são apontados como uma das principais substâncias naturais terapêuticas antioxidantes (SERINO & SALAZAR, 2019; KUMAR & GOEL, 2019). As fontes mais abundantes de polifenóis, principalmente flavonoides e ácidos fenólicos são própolis e vinho. Flavonoides e ácidos fenólicos têm propriedades antibacteriana, antifúngica, antiviral, antineoplásica, hepatoprotetoras, imunomoduladoras e anti-inflamatória. Seu uso tem sido apontado como benéfico em alergias, hipertensão, diabetes, entre outras doenças,

sendo que estes efeitos terapêuticos são frequentemente associados a atividade antioxidante (MEDIC-SARIC et. al, 2009). Os flavonoides são importantes interceptores de radicais livres, sintetizados a partir dos fenilpropanoides e do acetato. Encontram-se presentes na maioria das plantas, concentrado de sementes, frutos, cascas, raízes, folhas e flores (DORNAS, 2008). Há muitos anos a medicina oriental usa plantas condimentares e medicinais que contem flavonoides, no entanto, são pouco usados na terapia médica ocidental popular. (DORNAS, 2008).

A própolis constitui um fito-composto complexo, elaborada com material resinoso e balsâmico colhido pelas abelhas das flores, ramos, pólen e exsudatos de árvores (LUSTOSA et al, 2008). As abelhas o utilizam principalmente como selante e desinfetante. É usada para selar furos e rachaduras na colmeia suavizando a superfície interna e mantendo a temperatura, bem como para evitar intempéries e predadores. Devido a sua atividade antimicrobiana, também contribui para um ambiente interno asséptico e é usado para mumificar os corpos de pragas mortas que invadiram a colmeia e são grandes demais para serem removidas. (KOCOT et. al, 2018). A composição química da própolis além dos flavonoides também apresenta ácidos aromáticos e ésteres, aldeídos e cetonas, terpenóides e fenilpropanóides, esteroides, aminoácidos, polissacarídeos, hidrocarbonetos, ácidos graxos e componentes inorgânicos como ferro, cálcio, manganês, alumínio, entre outros (LUSTOSA et al, 2008). A própolis crua é tipicamente 50-60% de bálsamos e resinas, 30-40% de ácidos graxos e ceras, 5-10% de óleos essenciais, 5% de pólen e 5% de outras substâncias incluindo aminoácidos, vitaminas e micronutrientes. De acordo com dados da literatura mais de 300 componentes pertencem a polifenóis, terpenóides, esteróides, açúcares, aminoácidos e outros. (KOCOT et. al, 2018).

A própolis originária de zonas temperadas é classificada como do tipo álamo uma vez que a mesma se origina principalmente do exsudato de gema de *populus* spp. Seus principais componentes biologicamente ativos são flavonóides e ácidos fenólicos. A própolis de Bétula é encontrada na Rússia e vem da *betula verrucosa*, também possui flavonóides, porém diferentes dos da própolis de álamo. A própolis mediterrânea é característica de regiões subtropicais como Grécia, Ilhas Gregas, Croácia, Argélia,

Sicília, Malta. Em zonas tropicais por sua vez vários tipos de própolis derivados de muitas fontes diferentes foram identificados. No Brasil por exemplo existem 13 tipos diferentes de própolis, incluindo verde, vermelha e marrom, cujas principais fontes são *Baccharis dracunculifolia*, *Dalbergia ecastaphyllum* e *Hyptis divaricata*, respectivamente. Dentre estes tipos, o mais popular é o verde. (KOCOT et. al, 2018).

Estudos In vitro com células humanas (CACO-2 e HEP2) mostram que os flavonóides presentes na própolis verde são absorvidos pelas células intestinais e incorporados pelas células hepáticas (SHIMIZU et al, 2004). As atividades farmacológicas da própolis são conhecidas desde a antiguidade. Aristóteles considerava a própolis como um medicamento para o tratamento de doenças da pele, de feridas e de supurações (BERRETTA, 2007). Desta forma, há extensa exposição humana ao uso da própolis. Relatos de eventos adversos são raros e mais relacionados a dermatite de contato em uso tópico. Do ponto de vista antioxidante, há dezenas de estudos que avaliaram o potencial “in vitro” e em modelos de doenças realizados em animais experimentais. Foi realizada a avaliação da extração etanólica da própolis verde brasileira e de frações de partição em clorofórmio, n-butanol e hexano por meio da inibição da quimioluminescência produzidos por neutrófilos de coelhos após estimulação por complexos imunes (zimosan). O zimosan é um polissacarídeo que após opsonização com anticorpos naturais imitam um microorganismo e estimulam fagocitose por receptores de membrana produzindo ROS. O estudo concluiu que existe correlação entre a atividade antioxidante da própolis verde e a composição química de suas diferentes frações especialmente os flavonóides e ácido p-cumárico. (SIMÕES et. al, 2004). A maioria dos estudos relacionados às propriedades antioxidantes da própolis foram realizadas em meio de cultura celular ou em animais. Na literatura disponível existem apenas alguns estudos investigando o efeito antioxidante da própolis em humanos. (KOCOT et. al, 2018)

Com relação a ensaios clínicos, a informação disponível é mais limitada. Em 47 homens e mulheres, foi avaliado o efeito antioxidante da ingestão diária de extrato de própolis em pó por via oral por 30 dias. Foram estudadas as atividades da SOD, glutathione peroxidase e catalase, concentração de MDA plasmático, lipidograma,

glicose, ácido úrico, ferritina, juntamente com parâmetros hematológicos. Este foi o primeiro ensaio clínico com suplementação prolongada de extrato de própolis em humanos. Como resultado observou-se benefício somente na população masculina com redução na indução de radicais livres, peroxidação lipídica e aumento da atividade de SOD. O MDA mostrou diminuição de 23,2% e a SOD um aumento de 20,9% em sua atividade (MEDIC-SARIC et. al, 2009). Foi realizada a avaliação do efeito da administração oral da solução de própolis comercialmente disponível no Chile sobre o status oxidativo e o perfil lipídico em humanos. A solução foi ingerida na dosagem de 15 gotas, duas vezes ao dia, durante 90 dias. O resultado dessa suplementação de própolis foi uma diminuição de 67% da produção de peroxidação lipídica (TBARS), e 175% de aumento do nível de glutathione reduzida comparado com o parâmetro basal. Além disso também se observou um aumento na concentração de HDL comparado com a concentração basal. O estudo concluiu que a suplementação de própolis tem efeito antioxidante positivo e melhora do índice de HDL, podendo reduzir os riscos de eventos cardiovasculares (MUJICA et. al, 2017). O efeito da suplementação da própolis verde brasileira no status redox de pacientes com diabetes mellitus tipo 2 também foi estudado e observou-se uma associação entre a administração da própolis e o aumento do nível de GSH e polifenóis totais e diminuição de marcadores de oxidação. Os resultados mostraram que existe um efeito antioxidante da suplementação de própolis em pacientes com diabetes mellitus tipo 2, porém não há mudança nos parâmetros diabéticos como por exemplo diminuição da glicemia. (ZHAO et. al, 2015).

A composição qualitativa e quantitativa dos medicamentos devem ser monitoradas e é necessário que haja reprodutibilidade lote-a-lote. O extrato de própolis (EPP-AF®), cujos estudos resultaram no depósito de um pedido de patente junto ao INPI (PI0405483-0) foi padronizado e demonstrou reprodutibilidade lote-a-lote (3 lotes) (n=3) frente aos marcadores ácido caféico, p-cumárico, cinâmico, aromadendrina, isossakuranetina e artepelin C (De Castro et al. 2010), substâncias com importante efeito antioxidante “*in vitro*” (DANTAS SILVA et. Al, 2017), fato inédito, parâmetro essencial para se propor o desenvolvimento de um medicamento (Sforcin e Bankova, 2010). Além da reprodutibilidade, o mesmo demonstrou atividade anti-inflamatória (Reis et al. 2000), antiúlcera (Barros et al. 2007), antimicrobiana (Rezende et al. 2003),

antioxidante (Simões et al. 2004) e antifúngica (De Castro et al. 2010) em modelos experimentais, e já teve sua segurança demonstrada por (Reis et al. 2000), onde se determinou que a DL50 é maior que 3000mg/kg p.c. via oral, além de não ser um produto citotóxico nem apresentar potencial mutagênico (Tavares et al. 2007). A atividade anti-inflamatória do artepellin C (ácido 3,5-diprenil-hidroxicinâmico) foi avaliada em camundongos, mostrando redução da formação de edema de pata, migração celular e formação de prostaglandinas (PAULINO et al. 2008). Em humanos, o EPP-AF foi avaliado quanto a segurança em exposição de 15 dias com doses variadas de 125 a 500 mg/d por via oral, não mostrando sinais de toxicidade

A ação antioxidante da própolis merece especial atenção, pois existe uma correlação entre a alta concentração de flavonoides totais na própolis e a atividade antirradicais livres (LUSTOSA et al, 2008). Entretanto, embora haja clara atividade antioxidante “*in vitro*”, não se conhece se a EPP-AF® teria um potente efeito antioxidante “*in vivo*”. Desta forma a principal proposta deste projeto é avaliar a eficácia antioxidante de um extrato padronizado de própolis (EPP-AF®) em uso oral em voluntários saudáveis.

2. OBJETIVOS

Avaliar o efeito antioxidante em voluntários sadios do extrato padronizado de própolis EPP-AF® administrado por via oral.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram incluídos na investigação voluntários sadios, de ambos os gêneros, não fumantes, com idade entre 18-60 anos e com peso dentro do limite de 15% do peso considerado normal para homens e mulheres, levando-se em consideração altura e estrutura física. Atendendo a resolução CNS 251/97, não foram aceitos voluntários com ligação direta com o grupo de pesquisadores envolvidos com o projeto e voluntários que já haviam participado de pesquisas com medicamentos com intervalo menor que um ano.

Os voluntários incluídos na investigação foram submetidos à avaliação clínica (história médica e exame físico), exames clínicos, eletrocardiograma e exames laboratoriais (hemograma completo, urina tipo I, sorologia: ureia, creatinina, glicemia, bilirrubina total, TGO, ácido úrico, colesterol total, triglicérides, beta HCG para mulheres, sorologia para hepatites B e C e sorologia para HIV). A participação de voluntários do sexo feminino foi condicionada a que não estivessem em estado de gravidez ou em período de amamentação

Foram evitados voluntários fumantes e com histórico de abuso de álcool ou drogas. Foram incluídos na investigação apenas os voluntários que não apresentavam doenças cardíacas, renais, gastrintestinais, hepáticas, pulmonares, neurológicas, psiquiátricas, hematológicas ou metabólicas, que não apresentavam antecedentes de hipersensibilidade à medicamentos, que não estavam recebendo medicamentos uma semana antes do estudo ou durante a sua realização e que estavam disponíveis para participar de todas as etapas do estudo.

Os voluntários foram informados do estudo com detalhes e forneceram, por escrito, o consentimento livre e esclarecido. O protocolo clínico foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP (processo HCRP 5912/2012).

3.1. PROTOCOLO CLÍNICO

Foi realizado um estudo sequencial de duas fases, aberto, não randomizado, do tipo antes-depois, com o objetivo determinar o perfil de modificações de biomarcadores

relacionados ao status redox, como possíveis alvos de ação farmacodinâmica da própolis. O projeto envolveu o uso de duas doses distintas de EPP-AF® 375mg/d e 750 mg/d, VO, divididas em três tomadas por 5 ± 2 dias em cada dose, iniciada com a menor dose. Após a triagem (fase basal) e ao final de cada etapa, sangue e urina foram coletados, centrifugados e armazenados a -80 C até a realização das análises bioquímicas.

3.2. QUANTIFICAÇÃO DE MDA EM PLASMA

A formação de MDA (malontodialdeído) foi quantificado por método colorimétrico em plasma. Esta análise foi feita de acordo com o método proposto por Gerard-Monnier et al, 1998, com algumas adaptações. Foram adicionados 100µL de plasma em 300µl de solução de 10mM de 1-metil-fenilindol em acetonitrila e metanol (2:1, v/v) e 75µl de HCL puro (37%). Logo após, os eppendorfs foram agitados em vórtex e incubados em banho-maria a 45°C por 40 minutos. Após o banho, houve resfriamento das amostras em gelo e em seguida os eppendorfs foram centrifugados a 4000 rpm por 10 minutos. Do sobrenadante foi feita a leitura de absorvância com comprimento de onda de 586 nm (Epoch microplate Spectrophotometer gen 5 software). A concentração de MDA foi calculada comparando-a a uma curva de 1,1,3,3- tetrametoxipropano (TMP) hidrolisado.

3.3. QUANTIFICAÇÃO DE GSSG E GSH EM PLASMA POR CINÉTICA

A glutathiona reduzida e oxidada foi determinada no plasma de acordo com Rahman et al. (2006). O ensaio baseia-se na reação de GSH com 5,5' ditio-bis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) que produz o ácido 5' tio-2-nitrobenzóico (TNB), que possui uma absorvância máxima a 412 nm e oxidado aduto glutathiona-TNB (GS-TNB). A taxa de formação de TNB é proporcional à concentração de glutathiona total na amostra. As amostras de plasma (100 µL) foram colocadas em ácido metafosfórico a 5%, centrifugadas a 3000g a 4 ° C por 10 min e a camada clara superior foi mantida a 0-4 ° C durante ensaio. Vinte µL de amostra, em branco ou padrão foram inseridos na placa de reação. Em seguida, 120 µL de volume igual de DTNB (2 mg em 3 ml de KPE) e GR (40 µL de 250 unidades em 3 ml de KPE) preparados em tampão KPE (tampão fosfato

de potássio 0,1 M com sal dissódico EDTA 5 mM, pH 7,5) foram adicionados em cada poço e a reação foi permitida por 30s. A absorvância foi medida a 412 nm a cada 30s a 5 min após a adição de 60 µL de β-NADPH (2 mg em 3m KPE) em um leitor de microplacas (SpectraMax M5). A taxa de formação de ácido 2-nitro-5-tiobenzóico foi usada para calcular a concentração total de glutathiona contra uma curva padrão de GSH. Para o ensaio GSSG, foram adicionados 2 µL de 2-vinilpiridina à formação de 100 µL de ácido 2-nitro-5-tiobenzóico do plasma e a reação foi deixada por 2 horas no escuro. Então, 20 µL foram usados para a reação na placa como descrito acima. O GSSG foi calculado através da taxa de formação do ácido 2-nitro-5-tiobenzóico em comparação com a curva padrão do GSSG. O GSH reduzido foi calculado como valores totais de glutathiona - GSSG.

3.4. QUANTIFICAÇÃO DE FRAP (CAPACIDADE DE REDUÇÃO DO FERRO) EM PLASMA

O ensaio FRAP avaliou a capacidade dos antioxidantes da amostra em reduzir o complexo 2,4,6-tripiridyl-s-triazine férrico ([Fe(III)-(TPTZ)₂]³⁺ no complexo ferroso de cor azul intensa [Fe(II)-(TPTZ)₂]²⁺ em meio ácido. Os valores de FRAP foram calculados pela medida da absorvância a 593 nm. Foi preparado uma solução tampão de acetato 0,3 M, pH 3,6, utilizando-se 1,55g acetato de sódio triidratado (C₂H₃NaO₂·3H₂O), 8 mL ácido acético glacial (C₂H₄O₂) completados para 500 mL com água milli-Q. Foi transferido para um frasco âmbar devidamente etiquetado e armazenado em temperatura ambiente por tempo indeterminado. Em seguida foi preparada uma solução de HCl 40 mM (0,04 M). Colocou-se 125 mL de água milli-Q, 1,67 mL de ácido clorídrico concentrado, completado para 500 mL com água milli-Q. Em seguida a solução foi transferida para um frasco de vidro devidamente etiquetado e armazenado em temperatura ambiente por tempo indeterminado. Em sequência preparou-se uma solução de TPTZ 10 mM (0,01 M) utilizando 1,56g de TPTZ (2,4,6-tripiridyl-s-triazine, Sigma, nº cat T1253-5G, PM = 312,34 g/mol) completados para 500 mL com solução HCl 40 mM, transferidos para um frasco âmbar devidamente etiquetado e armazenamento sob refrigeração por até um mês. Próxima solução preparado foi de Cloreto Férrico 20 mM (0,02 M), utilizando 0,27g de cloreto férrico

($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{PM} = 270,30 \text{ g/mol}$) completados para 50 mL com água milli-Q, transferidos para um frasco âmbar devidamente etiquetado e armazenados sob refrigeração por até um mês. Próximo preparo foi de solução do Reagente FRAP que foi feito pelas misturas das soluções de tampão acetato e solução TPTZ com solução de cloreto férrico na razão 10:1:1. Também foi preparada uma solução padrão de sulfato ferroso de 0,05M. Para isso pesou-se 0,014g de sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e adicionou-se 1 mL de tampão acetato 0,3 M e foi transferido para um frasco âmbar devidamente etiquetado. A partir dessa solução foi feita diluição seriada de base 2. O ensaio de FRAP foi realizado na placa de 96 poços. Pipetou-se na placa 10 μL de água milli-Q e 300 μL de solução FRAP para fazer o branco. Em seguida foram pipetados em duplicata 10 μL de cada ponto da curva e adicionados 300 μL de solução FRAP. Em sequência para cada 10 μL de plasma foi adicionado 300 μL de solução FRAP e a placa foi incubada no espectrofotômetro a 37°C por 4 minutos e a leitura foi feita a 593 nm. Os resultados foram expressos como mM de Fe^{2+} .

3.5. QUANTIFICAÇÃO DE 8-ISOPROSTANO E 8-HIDROXI-DEOXY-GUANOSINA (8-OHDG) NA URINA POR ELISA

Amostras de urina foram centrifugadas a 3500 g por 5 minutos a 4°C . Após, foram diluídas em água mili-Q (1: 50 a 1:250) e pipetadas em placas de ELISA para 8-OHDG ou 8-isoprostanos de acordo com as instruções do fabricante (Cayman Chemical, USA). As leituras foram feitas em leitor de microplaca (SpectraMax M5, Molecular devices, USA) e as dosagens obtidas corrigidas pela dosagem de creatinina urinária realizadas no laboratório de análises clínicas do Hospital Universitário por método automatizado (Weiner, Argentina).

3.6. DOSAGEM DE VITAMINA E EM PLASMA

A Dosagem de vitamina E foi realizada por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC). Foram pipetados 200 μL de plasma em um tubo de ensaio e adicionados 400 μL de etanol e agitado. Em sequência colocou-se 400 μL de heptano. Foi agitado em vórtex por 1 min e fechado (com tampa adequada). Logo após centrifugou-se a 3000 rpm / 10 min. Em seguida foi retirado uma alíquota de 200 μL da fase orgânica (superior) e passada para outro tubo. A alíquota foi secada em fluxo de $\text{N}_2(\text{g})$ e

suspensa em 200 µL de fase móvel. após amostra preparada foi injetado 20 µL no HPLC. Para as análises, foi utilizado um cromatógrafo Shimadzu modelo LC-20AT; coluna tipo C-18 (250 x 4,6mm - 5µm); detector UV-visível modelo SPD-20A; fase móvel composta por acetonitrila:diclorometano:metanol 7:2:1; velocidade de fluxo de 1,0 mL/min e detecção em 292 nm. As concentrações foram determinadas por meio do uso de padrão externo e os resultados foram expressos em µmol/L de soro/plasma.

3.7. QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE DE SOD (SUPEROXIDO DISMUTASE)

Para a determinação da SOD foi usado Kit comercial (Sigma-Aldrich, USA cat. n. 19160) de acordo com as instruções do fabricante e a leitura em leitor de microplacas em 450nm (SpectraMax M5, Molecular devices, USA).

3.8. ANÁLISE DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (CAT)

Para a determinação da capacidade antioxidante total (CAT) foi utilizado o método do radical ABTS•+(2,2'azinobis-(3- ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)), modificado da metodologia descrita por RE et al. (1999). Inicialmente, foi formado o radical ABTS•+, a partir da reação de 7 mM de ABTS com 2,45 mM de persulfato de potássio, os quais foram incubados à temperatura ambiente e na ausência de luz, por 16 horas. Transcorrido esse tempo, a solução foi diluída em etanol até a obtenção de uma solução com absorvância de 0,70 (± 0,01). Para realizar as análises, foram adicionados 40 µL de plasma a 1960 µL da solução contendo o radical e determinou-se a absorvância em espectrofotômetro (Spectramax M5) a 734 nm, após 20 minutos de reação. Como solução-padrão, usou-se o antioxidante sintético Trolox nas concentrações de; 0,2; 0,4; 0,8;1,6; 3,2 e 6,4 mM em etanol. Todas as leituras foram realizadas em duplicata, e os resultados foram expressos em mM.

As determinações bioquímicas do estado REDOX foram feitas em colaboração com o laboratório de Nutrição da FMRP, coordenado pelo Prof. Dr. Alceu Jordão. Os exames bioquímicos foram realizados no laboratório de patologia clínica do HCFMRP-USP, conforme rotina do setor.

3.9. ANÁLISE DOS DADOS

Os dados foram descritos como média ou mediana, com respectivo desvio padrão ou variação interquartil. Dados considerados com distribuição normal foram analisados por ANOVA de medidas repetidas seguida de pós-teste de Tukey. Dados de distribuição não paramétrica foram analisados por ANOVA para medidas repetidas não paramétrica (Friedman) seguido de pós-teste de Dunn. Foi considerado como estatisticamente significativo, P valor <0,05. Os dados foram analisados por meio do Software Prism versão 6.0 (Graphapad Software, San Diego, CA, USA)

4. RESULTADOS

A Figura 1 corresponde ao fluxograma que descreve os participantes recrutados e que finalizaram o protocolo de pesquisa. As características clínicas dos participantes estão descritas na tabela 1.

CONSORT 2010 Diagrama de fluxo

Figura 1 - Fluxograma de recrutamento, seleção e análise do estudo clínico, de acordo com CONSORT.

Tabela 1 - Características dos participantes incluídos no estudo (n=34)

Variável		Média	Desvio padrão	IC 95%
Idade		30,6	8,1	28 – 33
Gênero	Homens	12	-	
	Mulheres	25		
Cor da pele	Branços	36 (97,3%)	-	
	Mulato	1 (2,7%)		
Peso (Kg)		69,5	13,2	65,0 - 73,9
IMC		24,0	2,9	23 – 25
Hemoglobina (g/DL)		13,8	1,5	13,3 – 14,3
Hematócrito (%)		40,7	4,2	39,3 – 42,1
Plaquetas (10 ³ µL)		248	48	231 – 264
Leucócitos Totais (10 ⁶ µL)		5,5	1,2	5,1 – 5,8
Uréia (mg/dL)		26,2	7,1	23,8 – 28,6
Creatinina Sérica (mg/dL)		0,89	0,14	0,84 – 0,94

continua

conclusão

Variável	Média	Desvio padrão	IC 95%
Sódio (mmol/L)	139,1	1,6	138,6 – 139,7
Potássio (mmol/L)	4,0	0,2	4,0 – 4,1
Glicemia (mg/dL)	81,2	6,2	79,0 – 83,2
Bilirrubina Total (mg/dL)	0,65	0,32	0,54 – 0,76
Bilirrubina Direta (mg/dL)	0,18	0,13	0,13 – 0,22
Bilirrubina Indireta (mg/dL)	0,49	0,27	0,40 – 0,58
TGO (u/L)	17,9	4,6	16,3 – 19,4
Gama Gt (u/L)	24,5	13,9	19,9 – 29,2
Fosfatase Alcalina (u/L)	146,2	49,9	129,5 – 162,8
Colesterol Total (mg/dL)	170,8	31,8	160,2 – 181,4
LDL (mg/dL)	104,4	25,2	96,4 – 113,4
HDL (mg/dL)	46,7	10,6	43,1 – 50,2
Triglicerides (mg/dL)	96,8	63,4	75,7 – 117,9

4.1. SISTEMAS NÃO ENZIMÁTICOS

A tabela 2 e figura 2 representam os dados do efeito do EPP-AF® sobre a atividade do FRAP e Vitamina E em plasma. Não foi observado diferenças entre os períodos basal e após o uso de EPP-AF® em doses diferentes.

Tabela 2 - Concentração do FRAP e Vitamina E em plasma antes e após uso de 7 dias de EPP-AF (375 e 750 mg/d) em voluntários saudáveis. Valores expressos em mediana e intervalo interquartil 25 a 75%

	Basal	EPP-AF 375 mg/d	EPP-AF 750 mg/d	P Valor
FRAP mmol/L	0,73 (0,63 - 088)	0,68 (0,61 - 0,81)	0,67 (0,61 - 0,88)	0,18
Vit. E µmol/L	21 (18,3 - 25,3)	20,3 (16,7 - 24,5)	20 (17,1 - 23,8)	0,09

Figura 2 - Concentração plasmática de FRAP (mmol/L) e vitamina E ($\mu\text{mol/L}$) antes e após o uso de EPP-AF (375 e 750 mg/d) por 7 dias. Box-Plot de Tukey.

4.2. PROTEÍNAS ANTIOXIDANTES E SISTEMAS ENZIMÁTICOS

A tabela 3 descreve as proteínas antioxidantes e o sistema enzimático estudados (GSH/GSSG e SOD). Houve uma elevação significativa da concentração

plasmática da GSH na dose de 375mg de EPP-AF comparada com o período basal (figura 3). A atividade da SOD também se elevou comparada com o período basal com o uso de EPP-AF 375 mg/d e de 750 mg/d. (figura 4). Não houve alterações significativas das quantidades de GSSG nos períodos antes e após o uso de EPP-AF, assim como da razão GSH/GSSG.

Tabela 3 - Concentração de GSH (mmol/L), GSSG, razão GSH/GSSG e atividade da SOD em plasma antes e após uso de 7 dias de EPP-AF (375 e 750 mg/d) em voluntários sadios. Valores expressos em mediana e intervalo interquartil 25 a 75%.

	Basal	EPP-AF 375 mg	P valor vs. Basal	EPP-AF 750 mg	P valor vs Basal
GSH (mmol/L)	1,23 (1,06 -1,34)	1,33 (1,06 – 1,47)	0,04	1,09 (1,02 – 1,17)	0,29
GSSG (mmol/L)	1,89 (1,3 – 2,32)	2,43 (2,71 – 3,39)	0,45	2,02 (1,45 – 2,78)	0,99
GSH/GSSG	0,63 (0,57 – 0,86)	0,56 (0,39 – 0,71)	0,99	0,50 (0,41 – 0,76)	0,23
SOD (U/mL)	1,4 (1,1 - 1,8)	2,5 (1,6 - 3,0)	< 0,0001	2,6 (1,8 -3,3)	< 0,0001

Figura 3 - Concentração plasmática de GSH (mmol/L), GSSG (umol/L) e razão GSH/GSSG antes e após o uso de EPP-AF (375 e 750 mg/d) por 7 dias. Box-Plot de Tukey.

Figura 4 - Concentração plasmática de SOD (U/L) antes e após o uso de EPP-AF (375 e 750 mg/d) por 7 dias. Box-Plot de Tukey.

4.3. MARCADORES DE DANO CELULAR

A tabela 4 descreve os efeitos da administração de EPP-AF sobre os danos oxidativos de membrana (8-isoprastano) e DNA (8-OHDG). Em relação ao 8-Isoprostanos (ng/mg de creatinina) houve uma redução significativa da excreção urinária de 8-ISO com o uso de EPP-AF. Aparentemente, o efeito máximo foi observado com a dose de 375 mg/d, uma vez que o aumento da dose não foi acompanhado de elevação da magnitude do efeito. A diferença em relação a concentração média basal foi de $-0,25$ ($-0,05$ a $-0,44$) com EPP-AF na dosagem de 375 mg/d e $-0,21$ ($-0,01$ a $-0,40$) com EFF-AF 750 mg/d. Houve redução da excreção urinária de 8-OHDG expressa como ng/mg de creatinina. Este efeito foi mais marcante com a dose de EPP-AF de 750mg/d. A tabela mostra os valores de média e intervalo de confiança 95% (IC 95%).

Tabela 4 – Excreção urinária de 8-ISO ng/mg de creatinina e 8-OHDG ng/mg de creatinina antes e após uso de 7 dias de EPP-AF (375 e 750 mg/d) em voluntários saudáveis. Valores expressos em média e intervalo de confiança (IC 95%)

	Basal	EPP-AF 375 mg	P valor vs. basal	EPP-AF 750 mg	P valor vs. basal
8-ISO (ng/mg de creatinina)	1,1 (0,9 – 1,3)	0,85 (0,75 – 0,95)	0,01	0,89 (0,74 – 1,0)	0,03
8-OHDG (ng/mg de creatinina)	15,7 (13,2 – 18,1)	13,9 (12,2 – 15,6)	0,16	11,6 (10,2 – 13,0)	0,004

Figura 5. Excreção urinária de 8 – isoprostano ng/mg de creatinina e 8-OHDG ng/mg de creatinina antes e após o uso de EPP-AF (375 e 750 mg/d).

A Tabela 5 descreve os danos oxidativos por MDA plasmático $\mu\text{mol/L}$ e a capacidade antioxidante total (CAT) em mmol/L . Não houve alterações significativas das quantidades de MDA plasmático e CAT nos períodos antes e após o uso de EPP-AF.

Tabela 5 – Danos oxidativos medidos em plasma pela formação de MDA $\mu\text{mol/L}$ e pela medida da capacidade antioxidante total (CAT) em mmol/L .

	Basal	EPP-AF 375 mg	P valor vs. Basal	EPP-AF 750 mg	P valor vs. Basal
MDA ($\mu\text{mol/L}$)	2,8 (1,5 -3,9)	2,4 (1,6 - 3,4)	0,22	3,2 (1,8 - 4,8)	0,06
CAT (mmol/L)	3,0 (2,9 - 3,1)	3,0 (2,8 - 3,1)	0,45	3,0 (2,9 - 3,0)	0,3

Figura 6 - Concentração plasmática de MDA (μmol/L) e CAT (mmol/L) antes e após o uso de EPP-AF (375 e 750 mg/d) por 7 dias. Box-Plot de Tukey.

Houve correlação entre as concentrações plasmáticas de SOD (U/L) e 8-ISO (ng/mg creatinina) com valor de $r=-0,21$ (-0,39 a -0,09, $p=0,03$) (figura 6). Não houve correlação entre a formação de 8-OHdG e a concentração de SOD ($p=0,98$).

Figura 7 – Correlação de Spearman entre a concentração plasmática de SOD (u/L) e a excreção urinária de 8-isoprostanos (ng/mg creatinina). r de Spearman = -0,21, $p=0,03$

5. DISCUSSÃO

O presente estudo observou que o uso do extrato padronizado de própolis verde brasileira (EPP-AF®) nas doses de 375 mg e 750 mg por via oral durante 7 dias em voluntários sadios foi associada à elevação da concentração em plasma da enzima superóxido dismutase (SOD), da concentração de glutathione reduzida (GSH) na dose de 375 mg e redução do dano celular oxidativo e de DNA, causado por radicais livres, evidenciados pela redução da excreção urinária de 8-ISO nas duas doses e 8-OHdG na dose de 750 mg respectivamente.

O efeito antioxidante da própolis é bem conhecido, particularmente por estudos *in vitro* e em células humanas. Esta atividade é atribuída basicamente à presença de flavonoides e de polifenóis (Viuda-Martos, 2002), entre eles derivados do ácido cafeico (Matsushige et al, 1996) e cinâmico (Hayashi et al, 1999, Banskota et al, 2000). O EPP-AF® apresenta, de forma distinta das outras apresentações de própolis estudadas, um alto teor de artepelin C, um outro agente com marcada atividade antioxidante (Zhang et al, 2017). O artepelin C é um fenol simples, antioxidante biodisponível na própolis brasileira. (SHIMIZU et al, 2004). Os resultados deste estudo vão de encontro com resultados de outros trabalhos que avaliaram o efeito antioxidante da própolis. Mujica et al. avaliou o efeito da administração oral (15 gotas, duas vezes ao dia por 90 dias) da solução de própolis comercialmente disponível no Chile sobre o status oxidativo e perfil lipídico em humanos. Os resultados mostraram diminuição de dano através da dosagem de TBARS e aumento da GSH. Jasprica et al. investigaram a influência de 30 dias de suplementação de própolis sobre as enzimas antioxidantes (SOD, glutathione peroxidase e CAT) e marcador de peroxidação lipídica (MDA) em indivíduos sadios. Após 15 dias de tratamento viu-se uma diminuição de MDA e após os 30 dias um aumento da SOD. Após os 30 dias os níveis de MDA estavam iguais ao basal novamente.

Este estudo mostrou o efeito antioxidante “*in vivo*” do EPP-AF® em participantes jovens e saudáveis, onde se espera baixa formação de oxidantes e com equilíbrio REDOX preservado. Estes resultados vão de encontro com os observados por Zhao et al. (2016) e AFSHARPOUR et al (2019), em pacientes com DM2, onde houve aumento da concentração de GSH e SOD. Além disso, Mujica et. (2017) relata elevação do

índice de HDL em pacientes com dislipidemias e risco cardiovascular e aumento de 175% da concentração de GSH comparado com a concentração basal após administração de solução de própolis. Por outro lado, em outro estudo com pacientes portadores de DM2 não foi observada melhora de desordens metabólicas com o uso de própolis verde brasileira (FUKUDA et al, 2015). Estes dados aparentemente controversos podem ser explicados pela diferente apresentação farmacêutica dos produtos, incluindo seu teor de extrato de própolis, a origem do produto e o tempo e dose utilizados. Neste estudo, o uso de EPP-AF® foi um diferencial relevante, uma vez que a composição lote-a-lote é estável, conhecida e padronizada.

O uso de propolis vem sendo associado com a melhora de condições de saúde na qual a inflamação é um denominador comum. Além do DM2 acima comentado, observou-se melhora do padrão cognitivo em pacientes com doença de Alzheimer, associado à redução de marcadores inflamatórios (Zhu et al, 2018). Ensaios clínicos têm demonstrado a eficácia da propolis no tratamento de doenças bucais associadas ao herpes vírus tipo I (Arenberger et al, 2017) e outras, como a estomatite protética (Pina et al, 2017), afta recorrente (Samet et al, 2007), e doença periodontal, sendo demonstrado neste último estudo a redução do estresse oxidativo (Giammarinaro et al, 2018). Com relação ao produto testado, um ensaio clínico com doentes renais crônicos com proteinúria mostrou redução dos marcadores da inflamação e da intensidade da proteinúria (Silveira et al, 2019). Desta forma, o presente estudo mostra que parte dos mecanismos anti-inflamatórios atribuídos a propolis pode estar associada ao seu potencial antioxidante. Este estudo não teve o objetivo de elucidar o potencial efeito anti-inflamatório do EPP-AF®. Entretanto, inflamação e estresse oxidativo são processos interligados e doenças metabólicas e cardiovasculares apresentam um estado de inflamação crônica de baixa intensidade que pode estar relacionado com o avanço da doença vascular e dos processos de aterosclerose (Baker et al, 2011; Forrester et al, 2018). O estresse oxidativo ativa a cascata inflamatória via NF-kB (nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B cells) e de forma interessante esta via é inibida pela superexpressão da SOD (Chen et al, 2013), que em nosso estudo mostrou correlação com a excreção urinária de 8-isoprostano.

A maioria dos efeitos antioxidantes foi observada com a dose de 375 mg/d (elevação do GSH, aumento da atividade da SOD e redução da formação de 8-isoprostanos em urina). A redução do dano ao DNA foi observada somente com doses mais elevadas. Parte deste fenômeno pode estar associada ao tempo curto de tratamento (7 dias) e ao baixo potencial de dano dos participantes (jovens e saudáveis).

Há apenas um estudo na literatura com a quantificação de 8-OHdG em humanos após uso de própolis. Neste estudo, um grupo recebeu placebo e o outro própolis. Em seguida foram submetidos a exame de colonoscopia e quantificação de marcadores tumorais para câncer de cólon através da análise de amostras de biópsia. Como resultado o grupo que recebeu própolis não apresentou benefício nos marcadores tumorais e houve um aumento da concentração de 8-OHdG. (WU et. al, 2003). Este efeito pode ter sido ocasionado pelo preparo da colonoscopia que usa agentes laxativos e que podem ter promovido dano celular. Neste contexto, o presente trabalho mostra que o EPP-AF® nas doses de até 750mg/d é seguro e não promove dano por efeito oxidante ou tóxico.

A atividade antioxidante de produtos naturais está correlacionada ao aumento das defesas antioxidantes endógenas (sistemas enzimáticos ou aumento da concentração de proteínas antioxidantes) ou diminuição da formação de radicais livres, pela presença de substâncias antioxidantes como os polifenóis. Os resultados das análises de FRAP, vitamina E e capacidade antioxidante total (CAT) não se modificaram, sugerindo que o meio de varredura antioxidante do EPP-AF não parece ser pela presença circulante de antioxidantes exógenos. Ainda, MDA em plasma também não mostrou efeito antioxidante do EPP-AF®. Por outro lado, o aumento da SOD e da GSH sugere que substâncias presentes no EPP-AF® possuem a capacidade de elevação das vias endógenas antioxidantes. Particularmente, pudemos observar a correlação entre a atividade da SOD e a formação de 8-ISO em urina. Dado o fato de que os voluntários estudados apresentam equilíbrio redox, uma vez que são saudáveis e jovens, não se pode excluir que as substâncias com potencial efeito antioxidante presentes no EPP-AF® contribuam para o efeito global antioxidante observado do produto, com relação a redução de dano celular. Novos estudos com pacientes com

doenças onde se espera uma maior formação de radicais livres podem auxiliar na melhor compreensão dos mecanismos antioxidantes “in vivo” do EPP-AF®.

O desenho deste estudo se apresenta como principal limitação. Por se tratar de um estudo tipo “prova de conceito” optou-se por um desenho tipo “antes-depois”, aberto, não randomizado, não controlado por placebo, o que pode ampliar a magnitude do efeito observado. Ainda as doses foram elevadas sem período de wash-out e um efeito acumulativo de dose pode ter ocorrido. Porém o objetivo principal era mostrar se há efeito antioxidante do EPP-AF® em voluntários saudáveis e o meio pelo qual este efeito ocorre. Apesar das limitações supracitadas o estudo apresenta pontos fortes por utilizar voluntários saudáveis, portanto, com perfil oxidativo baixo, exposição a doses distintas via oral, com um conjunto de biomarcadores específicos para detecção de lesão redox em humanos e ter utilizado extrato de própolis padronizado com componentes conhecidos.

6. CONCLUSÃO

Em conclusão, o presente estudo mostra um importante efeito antioxidante do EPP-AF® em humanos, associado a um aumento da capacidade de proteção endógena para danos por estresse oxidativo. Além disso o EPP-AF® mostrou-se bem tolerado e seguro nas doses utilizadas e pode ser usado como suplementação antioxidante.

REFERÊNCIAS

AFSHARPOUR, F; JAVADI, M; HASHEMIPOUR, S; KOUSHAN, Y; KHADEM HAGHIGHIAN, H; Propolis supplementation improves glycemic and antioxidant status in patients with type 2 diabetes: A randomized, double-blind, placebo-controlled study, **Complementary Therapies in Medicine** (2019), <https://doi.org/10.1016/j.ctim.2019.03.00>

AHMADINEJAD, F.; MØLLER, S. G.; HASHEMZADEH-CHALESHTORI, M.; BIDKHORI, G.; JAMI, M. S. Molecular mechanisms behind free radical scavengers function against oxidative stress. **Antioxidants**, [s. l.], v. 6, n. 3, p. 1–15, 2017.

ARENBERGER, P. et al. Comparative Study with a Lip Balm Containing 0.5% Propolis Special Extract GH 2002 versus 5% Aciclovir Cream in Patients with Herpes Labialis in the Papular/Erythematous Stage: A Single-blind, Randomized, Two-arm Study. **Current Therapeutic Research - Clinical and Experimental**, v. 88, p. 1–7, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.curtheres.2017.10.004>>.

ARNAUD, J, et al. Simultaneous determination of retinol, α -tocopherol and β -carotene in serum by isocratic HPLC. *J. of Chromatogr.* v. 572, p. 103-116, 1991.

BAKER, R. G.; HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. NF- κ B, inflammation and metabolic disease. **Cell Metab**, v. 13, n. 1, p. 1–24, 2011.

BANSKOTA, Arjun H. et al. Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 72, n. 1–2, p. 239–246, 2000.

BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: Conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutricao**, v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010.

BARROS, P. M. et al. Effect of Brazilian green propolis on experimental gastric ulcers in rats. **J Ethnopharmacol**, v. 110, p. 567–571, 2007.

BENZIE, I. F.; STRAIN JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Anal Biochem**. v.15, n. 1, p. 70-76, 1996.

BERRETTA, A. A. Pesquisa pré-clínica e clínica de um gel termorreversível contendo extrato padronizado de própolis (EPP-AF) para a redução do tempo de cicatrização de lesões em pacientes queimados. 2007. 153 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto.

CASTRO, P. A. DE et al. Molecular Characterization of Propolis-Induced Cell Death in *Saccharomyces cerevisiae* □ †. **Eukaryotic Cell**, v. 10, n. 3, p. 398–411, 2011.

CHANG, C. et al. Mycotoxin Citrinin Induced Cell Cycle G2 / M Arrest and Numerical Chromosomal Aberration Associated with Disruption of Microtubule Formation in Human Cells. **Toxicol. sci.**, v. 119, n. 1, p. 84–92, 2011.

CHEN, C. J. et al. SIRT3 protects cardiomyocytes from oxidative stress-mediated cell death by activating NF- κ B. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 430, n. 2, p. 798–803, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.11.066>>.

CHEN, Y. et al. Glutathione defense mechanism in liver injury: Insights from animal models. **Food and Chemical Toxicology**, [s. l.], v. 60, p. 38–44, 2013.

DORNAS, W.C. et al. Flavonóides : potencial terapêutico no estresse oxidativo. Revista de **Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v. 28, n. 3, p. 241–249, 2008.

FERREIRA, A. L.; MATSUBARA, L. S. Free radicals: concepts, associated diseases, defense system and oxidative stress. **Revista da Associação Médica Brasileira (1992)**, v. 43, n. 1, p. 61–68, 1997.

FITZMAURICE, G.M.; LAIRD, N.M.; WARE, J.H. **Applied Longitudinal Analysis**. 2 ed. New York: John Wiley & Sons, 2011.

FORRESTER, Steven J. et al. Reactive oxygen species in metabolic and inflammatory signaling. **Circulation Research**, v. 122, n. 6, p. 877–902, 2018.

FUKUDA, T. et al. Effect of Brazilian green propolis in patients with type 2 diabetes: A double-blind randomized placebo-controlled study. **Biomedical Reports**, v. 3, n. 3, p. 355 – 360, 2015.

GÉRARD-MONNIER D. et al. Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4- hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. **Chem Res Toxicol**. V.11, p.1176-1183, 1998.

GIAMMARINARO, E. et al. Propolis as an adjuvant to non-surgical periodontal treatment: A clinical study with salivary anti-oxidant capacity assessment. **Minerva Stomatologica**, v. 67, n. 5, p. 183–188, 2018.

GLORIEUX, C.; CALDERON, P. B. Catalase, a remarkable enzyme: Targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. **Biological Chemistry**, [s. l.], v. 398, n. 10, p. 1095–1108, 2017.

HAYASHI, K. et al. Isolation of Antioxidative Compounds from Brazilian Propolis : 3, 4-Dihydroxy-5-prenylcinnamic Acid, a Novel Potent Antioxidant. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 47, n. 11, p. 1521–1524, 2002. Disponível em: <<http://www.mendeley.com/research/geology-volcanic-history-eruptive-style-yakedake-volcano-group-central-japan/>>.

HUANG, D. Dietary Antioxidants and Health Promotion. **Antioxidants**, v. 7, n. 9, p. 1–3, 2018.

HUSSAIN, T. et al. Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? **Oxid Med Cell Longev**, [s. l.], v. 2016, 2016

JASPRICA, I. et al. In vivo study of propolis supplementation effects on antioxidative status and red blood cells. **J Ethnopharmacol**, v. 110, p. 548–554, 2007.

KOCOT, J. et al. Antioxidant Potential of Propolis , Bee Pollen , and Royal Jelly : Possible Medical Application. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2018, p. 1–29, 2018.

KUMAR, Naresh; GOEL, Nidhi. Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. **Biotechnology Reports**, v. 24, p. e00370, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00370>>.

LIU, Q.-M.; JIANG, J.-G. Antioxidative Activities of Medicinal Plants from TCM. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 12, n. 11, p. 1154–1172, 2012.

LUSTOSA, S.R. et al. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Rev. bras, framacong.** v. 18, n. 3, p. 447-454, 2008

MATSUSHIGE, K. et al. Potent free radical scavenging activity of dicaffeoyl quinic acid derivatives from propolis. **Journal of Traditional Medicines** v.13, p. 217–228, 1996.

MEDIC-SARIC, M. et al. From functional food to medicinal product: Systematic approach in analysis of polyphenolics from propolis and wine. **Nutrition Journal**, v. 8, n. 33, p. 1–18, 2009.

PASUPULETI, V. R. et al. Review Article Honey , Propolis , and Royal Jelly : A Comprehensive Review of Their Biological Actions and Health Benefits. **Oxid Med Cell Longev**,v. 2017, 2017.

PAULINO, N. et al. Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, Artepillin C, in Brazilian propolis. **European Journal of Pharmacology**, v. 587, n. 1–3, p. 296–301, 2008.

PELUSO, I.; SERAFINI, M. Antioxidants from black and green tea: from dietary modulation of oxidative stress to pharmacological mechanisms. **Br J Pharmacol.**, v. 174, p. 1195–1208, 2017.

PINA, G. D. M. S. et al. Efficacy of Propolis on the Denture Stomatitis Treatment in Older Adults: A Multicentric Randomized Trial. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, 2017.

RAHMAN I, KODE A, BISWAS SK. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. **Nature Protocol**. v.1, n.6, p. 3159-3165, 2006.

RE, R.; PELEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICEEVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v.26, n.9-10, p.1231-1237, 1999.

REIS, C. M. F. et al. Atividade antiinflamatória, antiúlcera gástrica e toxicidade subcrônica do extrato etanólico de própolis. **Rev. Bras. Farmacogn**, v. 9, n. 10, p. 43–52, 2000.

REZENDE, G.P.S.R., PIMENTA, F.C., COSTA, L. R. R. S. Antimicrobial activity of two brazilian commercial propolis extracts. **Braz. J. Oral Sci**, v. 5, n. 16, p. 967–970, 2006.

SAMET, N. et al. The effect of bee propolis on recurrent aphthous stomatitis: A pilot study. **Clinical Oral Investigations**, v. 11, n. 2, p. 143–147, 2007.

SERINO, A.; SALAZAR, G. Protective role of polyphenols against vascular inflammation, aging and cardiovascular disease. **Nutrients**, v. 11, n. 1, p. 1–23, 2019

SFORCIN, M. J.; BANKOVA, V. Propolis : Is there a potential for the development of new drugs ? **J Ethnopharmacol**, v. 133, p. 253–260, 2011.

SHIMIZU, K. et al. Antioxidative bioavailability of artemillin C in Brazilian propolis. **Arch Biochem Biophys**, v. 424, p. 181–188, 2004.

SILVA, R. P. D. et al. Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts. **PLoS ONE**, v. 12, n. 3, p. 1–18, 2017.

SILVEIRA, M. A. et al. Effects of Brazilian green propolis on proteinuria and renal function in patients with chronic kidney disease : a randomized . **BMC Nephrology**, v. 20, n. 140, p. 1–12, 2019.

SIMÕES, L. M. C. et al. Effect of Brazilian green propolis on the production of reactive oxygen species by stimulated neutrophils. **J Ethnopharmacol**, v. 94, p. 59–65, 2004.

TAVARES, D. C. et al. Effects of Propolis Crude Hydroalcoholic Extract on Chromosomal Aberrations Induced by Doxorubicin in Rats. **Planta Med**, v. 73, n. 15, p. 1531–1536, 2007.

VIUDA-MARTOS, M. et al. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 9, p. 117–124, 2008.

WU, L. L. et al. Urinary 8-OHdG : a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer , atherosclerosis and diabetics. **Clin Chim Acta.**, v. 339, p. 1–9, 2004.

ZHAO, L. et al. Brazilian Green Propolis Improves Antioxidant Function in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. **Int J Environ Res Public Health**, v. 13, n. 498, p. 1–9, 2016.

ZHU, W. et al. Effects and mechanisms of resveratrol on the amelioration of oxidative stress and hepatic steatosis in KKAY mice. **Nutrition & Metabolism**, v. 11, n. 1, p. 1–11, 2014.

ANEXO A – Ofício ANVISA

DE: COPEM
ASSUNTO: COMUNICADO ESPECIAL [OE] nº 1015818139

ENVIADA EM: 02/12/2013 15:27:00

Ofício nº 1015818139/2013, COORDENAÇÃO DE PESQUISAS E ENSAIOS CLÍNICOS/ANVISA**Brasília, 02/12/2013****Ao (À) Senhor (a)**Manoel Eduardo Tavares Ferreira
APIS FLORA INDUSTRIAL E COMERCIAL LTDA
RUA TRIUNFO, Nº 945 SANTA CRUZ
CEP 14020670. RIBEIRÃO PRETO/SP

Ref.: Processo: 25351.430954/2012-15

Gerência Geral de Medicamentos - GGMED
Gerência de Avaliação da Segurança e Eficácia - GESEF**COMUNICADO ESPECIAL EM PESQUISA CLÍNICA**

Nº 235/2013

Expediente do CE: 0989353/13-9

Brasília, 02/12/2013

Empresa: APIS FLORA INDUSTRIAL E COMERCIAL LTDA

[Fax:](#)

Prezado(a) Senhor(a),

O Projeto de Pesquisa Clínica, foi analisado e aprovado por esta gerência. Considerando que o mesmo está de acordo com a RDC 39/08, autorizamos a sua execução no(s) centro(s) abaixo especificado(s):

Local de Realização do Estudo	Investigador	Expediente
FUNDACAO DE APOIO AO ENSINO PESQUISA E ASSISTENCIA HCFMRP	EDUARDO BARBOSA COELHO	0617103126

ESTUDO

Protocolo Clínico: não há

Processo: 25351430954201215

Expediente da Anuência: 0617103126

Título do Estudo: "AVALIAÇÃO DO EXTRATO PADRONIZADO DE PRÓPOLIS APIS FLORA (EPP-AF) COMO POTENCIAL MEDICAMENTO ANTI-INFLAMATÓRIO DE USO ORAL" VERSÃO 3 DE 29/08/2013

Assunto da Anuência: ENSAIOS CLÍNICOS - Anuência em Processo de Pesquisa Clínica - Medicamentos

DESCRIÇÃO DO ESTUDO

Fase do Estudo: II

Medicamento / Produto: PRÓPOLIS (APIS FLORA)

Classe Terapêutica: PRODUTOS NATURAIS

CID 10: Z418 - Outros procedimentos para outros propósitos exceto cuidados de saúde

Agência Nacional de Vigilância Sanitária-Anvisa

Setor de Indústria e Abastecimento (SIA) - Trecho 5, Área Especial 57 / Lote 200

CEP: 71205-Brasília/DF

Fone: 0800-642 9782

www.anvisa.gov.br

Controle 5026D8078BC4470383C7509C84018854

Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Setor de Indústria e Abastecimento (SIA) – Trecho 5 – Área Especial 57 - Brasília (DF) - CEP
71205-050 - Tel: (61) 3462-6000 - Disque Saúde: 0 800 61 1997

Copyright © 2003 Anvisa

Caixa Postal

s

ANEXO B – Parecer Consubstanciado do CEP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da eficácia e segurança clínica de anti-inflamatório de uso oral obtido a partir de princípio ativo da biodiversidade brasileira

Pesquisador: EDUARDO BARBOSA COELHO

Área Temática: Área 3. Fármacos, medicamentos, vacinas e testes diagnósticos novos (fases I, II e III) ou não registrados no país (ainda que fase IV), ou quando a pesquisa for referente a seu uso com modalidades, indicações, doses ou vias de administração diferentes daquelas estabelecidas, incluindo seu emprego em combinações.

Versão: 3

CAAE: 02340012.1.0000.5440

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP -

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Outros

Detalhe: EMENDA VERSAO 3 DE 29-08-13

Justificativa: PREZADA PRESIDENTE, CEP FMRP-USP.

Data do Envio: 29/08/2013

Situação da Notificação: Aguardando revisão do parecer do colegiado

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 388.237

Data da Relatoria: 29/08/2013

Apresentação da Notificação:

O pesquisador responsável pelo estudo solicita em carta enviada ao CEP em 29/08/2013 avaliação da emenda ao protocolo ¿Avaliação do Extrato padronizado de própolis Apis Flora (EPP--¿AF) como potencial medicamento anti--¿inflamatório de uso oral¿ realizadas para atender exigências da ANVISA para a obtenção de comunicado especial (CE). As modificações realizadas não mudam os objetivos do protocolo e não ferem com os critérios de inclusão e exclusão estabelecidos.

Objetivo da Notificação:

Avaliação da emenda ao protocolo ¿Avaliação do Extrato padronizado de própolis Apis Flora (EPP--

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRAO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br

Continuação do Parecer: 388.237

¿AF) como potencial medicamento anti-¿inflamatório de uso oral¿ realizadas para atender exigências da ANVISA para a obtenção de comunicado especial (CE).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A nova versão do projeto de pesquisa (versão 3 de 29/08/2013) não altera os riscos e benefícios já apresentados anteriormente.

Comentários e Considerações sobre a Notificação:

As modificações realizadas no projeto de pesquisa (versão 3 de 29/08/2013), não mudam os objetivos do protocolo e não ferem com os critérios de inclusão e exclusão já estabelecidos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Não há considerações.

Recomendações:

Não há recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O CEP tomou ciência da emenda solicitada pelo pesquisa no projeto (versão 3 de 29/08/2013) de acordo com as exigências da ANVISA.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

RIBEIRÃO PRETO, 09 de Setembro de 2013

Assinador por:
MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
(Coordenador)

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br

ANEXO C – Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos

RBR-9zmfs9**Avaliação da Eficácia e Segurança Clínica de Anti-inflamatório de Uso Oral Obtido a partir de Princípio Ativo da Biodiversidade Brasileira**

Data de registro: 30 de Maio de 2012 às 16:26

Last Update: 21 de Ago. de 2013 às 15:27

Tipo do estudo:

Intervenções

Título científico:

PT-BR

Avaliação da Eficácia e Segurança Clínica de Anti-inflamatório de Uso Oral Obtido a partir de Princípio Ativo da Biodiversidade Brasileira

EN

Evaluation of Clinical Safety and Efficacy of an Anti-inflammatory Obtained from Active Ingredient of the Brazilian Biodiversity

Identificação do ensaio

Número do UTN: U1111-1131-3520

Título público:

PT-BR

Avaliação da Própolis Verde como Anti-inflamatório de Uso Oral

EN

Evaluation of Green Propolis as a oral Anti-inflammatory Drug

Acrônimo científico:**Acrônimo público:**Identificadores secundários:

1704/2012

Órgão emissor: Comitê de ética em pesquisa em seres humanos do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Nº 02340012.1.0000.5440

Órgão emissor: Plataforma Brasil - CAAE

Patrocinadores

Patrocinador primário: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - FMRP

Patrocinadores secundários:

Instituição: Apis Flora Ind. Com. Ltda

Fontes de apoio financeiro ou material:

Instituição: FINEP

Condições de saúde

Condições de saúde ou problemas:

Voluntários sadios

PT-BR

Healthy volunteers

EN

Descritores gerais para as condições de saúde:

Z00-Z99:XXI - Fatores que influenciam o estado de saúde e o contato com os serviços de saúde

PT-BR

Z00-Z99:XXI - Factors influencing health status and contact with health services

EN

Descritores específicos para as condições de saúde:

SP5.001.047.138: Avaliação de Eficácia-Efetividade de Intervenções

PT-BR

SP5.001.047.138: Evaluación de Eficacia-Efectividad de Intervenciones

ES

SP5.001.047.138: Evaluation of the Efficacy-Effectiveness of Interventions

EN

Intervenções

Categorias das intervenções

Drug

Intervenções:

Segurança 1: Duas fases com 16 voluntários sadios. Fase I: Voluntários sadios fenotipados e genotipados submetidos a "Cooperstown 5 + 1 Cocktail". Administração conjunta de midazolam endovenoso (0,025mg/kg), cafeína (100mg por via oral), omeprazol (20 mg por via oral), metoprolol (100mg/via oral). Fase II: 125 mg de EPP-AF® por via oral três vezes ao dia por 15 dias seguido da administração do coquetel ao final do 15º dia. Segurança 2 (Avaliação do potencial inibidor da PGP): Duas fases, com 14 voluntários sadios. Fase I: 120 mg fexofenadina via oral, dose única. Fase II: 125 mg de EPP-AF® por via oral em três vezes ao dia por sete dias, seguido de via oral 125 mg de EPP-AF® em conjunto com 120mg de fexofenadina por via oral no oitavo dia. Eficácia 40 voluntários sadios. Administração de doses crescentes de EPP-AF® (375mg, 750 mg e 1500 mg/dia, via oral) por 5 dias em cada dose, seguidos de uma fase com período de tratamento com 200 mg de Celecoxib de 12 em 12 horas por via oral por 5 dias.

PT-BR

Safety and efficacy protocol, non-randomized and without placebo usage. Safety 1: Two phases protocol with 16 healthy volunteers. 16 healthy volunteers are administered a drug cocktail containing: Midazolam (0.025 mg/kg intravenous), caffeine (100mg orally), omeprazole (20 mg orally), metoprolol (100mg orally) and losartan (25 mg orally) for phenotyping some liver enzymes. In a second phase, the same 16 healthy volunteers are administered propolis extract (EPP-AF®) 125 mg orally three times a day for 15 days followed by the cocktail administration at the end of day 15. Safety 2 (Evaluation of the potential inhibitor of PGP): Two phases with 14 healthy volunteers. Phase I: Administration of fexofenadine 120 mg orally. Phase II: EPP-AF® 125 mg orally three times a day is administered for seven days followed by co-administration of 125 mg EPP-AF® and fexofenadine 120 mg orally on day eight. Efficacy Protocol: 40 healthy volunteers. Administration of increasing doses of EPP-AF® (375mg, 750 mg and 1500 mg/day orally) for 5 days at each dose followed by a phase of celecoxib

EN

200 mg twice a day orally for 5 days.

Descritores para as intervenções:

C25.723.276: Toxicidade de Drogas

PT-BR

C25.723.276: Toxicidad de Medicamentos

ES

SP5.001.047.153: Eficácia

PT-BR

SP5.001.047.153: Eficacia

ES

Recrutamento

Situação de recrutamento: Recruiting

País de recrutamento

Brazil

Data prevista do primeiro recrutamento: 2013-01-01

Data prevista do último recrutamento: 2015-01-01

Tamanho da amostra alvo:

Gênero para inclusão:

Idade mínima para inclusão:

Idade máxima para inclusão:

70

-

18 Y

60 Y

Critérios de inclusão:

Serão incluídos na investigação voluntários saudáveis, de ambos os gêneros, não fumantes, com idade entre 18-60 anos e com peso dentro do limite de 15% do peso considerado normal para homens e mulheres, levando-se em consideração altura e estrutura física. A participação de voluntários do sexo feminino está condicionada a que não estejam em estado de gravidez ou em período de amamentação.

PT-BR

Healthy volunteers of both genders, non-smokers, aged 18 to 60 years and weighing within 15% of the normal weight for men and women taking into account their height and physical structure will be included. Participation of female volunteers is conditioned to not be pregnant or breastfeeding.

EN

Critérios de exclusão:

Serão evitados voluntários fumantes e com histórico de abuso de álcool ou drogas. Diagnósticos de patologias cardíacas, renais, gastrintestinais, hepáticas, pulmonares, neurológicas, psiquiátricas, hematológicas ou metabólicas. Antecedentes de hipersensibilidade a medicamentos, que estejam recebendo medicamentos uma semana antes do estudo ou durante a sua realização e que não estejam disponíveis para participar de todas as etapas do estudo.

PT-BR

Volunteers with a history of smoking, alcoholism or drugs abuse, diagnosed as having any cardiac, renal, gastrointestinal, hepatic and pulmonary disease, neurological, psychiatric, hematological or metabolic disorders will be excluded. Also individuals with any known hypersensitivity to drugs who are receiving medications one week before the study or during its implementation and not willing to participate in all stages of this study will not be accept.

EN

Tipo do estudo

Desenho do estudo:

PT-BR	EN
Ensaio clínico de segurança e eficácia cruzado, aberto e não randomizado, de fase 2.	Phase 2 crossover, open-label and non-randomized safety and efficacy clinical trial.

Programa de acesso expandido	Enfoque do estudo	Desenho da intervenção	Número de braços	Tipo de mascaramento	Tipo de alocação	Fase do estudo
False	Other	Other	2	Abstr	Non-randomized-controlled	2

Desfechos**Desfechos primários:**

PT-BR	EN
<p>Para os protocolos de segurança o desfecho esperado é que o EEP-AF não promova alteração significativa da atividade da P-gP ou das isoformas do CYP ensaiadas. A avaliação estatística da interação EPP-AF®-fexofenadina será feita pela diferença da razão entre as médias geométricas dos parâmetros farmacocinéticos da fexofenadina sozinha ou associada ao EEP-AF. A conclusão de "não interação" ocorrerá se o IC90% para a razão log AUC ou razão log Cmax da fexofenadina na presença e ausência de EPP-AF® se encontrar dentro do intervalo de 0,80-1,25 para o AUC e 0,70-1,43 para o Cmax. Para as isoformas do CYP será feita estratégia semelhante utilizando as alterações das razões de metabolização, AUC ou clearance de acordo com o marcador. Para o protocolo de eficácia o desfecho esperado é o de que o extrato de própolis reduza de forma dose dependente a geração urinária de PGE2 em ao menos 50% da atividade basal em sua dose máxima.</p>	<p>The endpoint expected on safety protocols is a non-significant change on activity of cytochrome P450 enzymes or P-glycoprotein. The statistical approach for the analysis of potential interaction between propolis extract-fexofenadine will be based on geometrical mean ratio of the observed pharmacokinetic measures for fexofenadine with and without the propolis extract (EPP-AF). The conclusion of non-interaction will be done if the CI90% for log AUC ratio or log Cmax ratio of fexofenadine obtained with or without EPP-AF lies on 0.80 to 1.25 interval to AUC and 0.70 to 1.43 to Cmax. For cytochrome P450 interaction the same strategy will be done, using CI90% for AUC, metabolic ratio or clearance according the probe (drug) used. For efficacy protocol the endpoint is set as a reduction of at least 50% from baseline urinary Prostaglandin E2 excretion with the use of higher doses of propolis extract (EPP-AF)</p>

Desfechos secundários:

PT-BR	EN
Não se aplica.	Not applicable.

ContatosContatos para questões públicas

Nome completo: Eduardo Barbosa Coelho

Endereço: Avenidas Bandeirantes, n.º 3900, Campus Universitário, Monte Alegre

Cidade: Ribeirão Preto / Brazil

CEP: 14049-900

Fone: +55(16)3602-2543

E-mail: ebc Coelho@fmrp.usp.br

Filiação: Hospital das Clínicas da Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto

Contatos para questões científicas

Nome completo: Eduardo Barbosa Coelho

Endereço: Avenidas Bandeirantes, n.º 3900,
Campus Universitário, Monte Alegre

Cidade: Ribeirão Preto / Brazil

CEP: 14049-900

Fone: +55(16)3602-2543

E-mail: ebc Coelho@fmrp.usp.br

Filiação: Hospital das Clínicas da Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto

Contatos para informação sobre os centros de pesquisa

Nome completo: Jose Alexandre Crippa

Endereço: Unidade de Pesquisa Clínica - Av
Bandeirantes 3900 - 12 andar

Cidade: Ribeirão Preto / Brazil

CEP: 14049-900

Fone: +55(16)3602-1000

E-mail: upc-hc@hcrp.fmrp.usp.br

Filiação: Hospital das Clínicas da Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto

Links adicionais:

[Download no formato ICTRP](#)

[Download no formato XML OpenTrials](#)

ANEXO D – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO, versão 2 de

21/10/2015.

(Pesquisa Científica em Seres Humanos Resoluções CNS 466/12 e 251/97)

1-Identificação do Voluntário

Nome: Sexo:

Identidade:

Data de Nascimento:/...../..... Idade:

Endereço:

Telefone: Celular:

2-Informações sobre a pesquisa

Título: Avaliação da eficácia e segurança clínica de anti-inflamatório de uso oral obtido a partir de princípio ativo da biodiversidade brasileira- Subprojeto 2: Avaliação de Eficácia do extrato de própolis como anti-inflamatório oral

Pesquisadores envolvidos: Prof. Dr. Eduardo Barbosa Coelho (Pesquisador Principal), tel 16-3602-2543; Gabriel Tavares do Vale (Mestrando FMRP-USP), tel 16-81006176. Profa. Dra. Vera Lucia Lanchote (Responsável pela Etapa Analítica FCFRP-USP), tel 16-3602-4699; Profa. Dra. Andresa Aparecida Berretta e Silva (Apis Flora), tel 16-35144411. O telefone do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HC/FMRP-USP é 16-3602-2228.

3-Informações ao voluntário

Justificativa e objetivos da pesquisa

Justificativa e objetivos da pesquisa

A própolis, um produto natural produzido por abelhas, tem sido usado como remédio há muitos anos. Assim como o mel, existem muitos tipos diferentes de própolis, que podem ter efeitos também diferentes quando usados como remédio. Este estudo pretende saber se uma das preparações de própolis produzida pela empresa Apis Flora de Ribeirão Preto pode apresentar efeito anti-inflamatório semelhante a um dos medicamentos vendidos na farmácia para controle da dor, o celecoxibe (Celebra®).

Procedimentos

Para participar do estudo, você será submetido a exames clínicos e laboratoriais, com coleta de sangue e urina para saber se você não tem nenhum problema de saúde. Os exames que serão realizados envolvem: consulta médica (história médica e exame físico), exames clínicos, eletrocardiograma e exames laboratoriais (hemograma completo, urina tipo I, sorologia: ureia, creatinina, glicemia, bilirrubina total, TGO, colesterol total, triglicérides, beta HCG para

mulheres, sorologia para hepatites B e C e sorologia para HIV). Com esses exames poderemos detectar doenças do coração, fígado, problemas no sangue, nos rins e saber se você teve ou tem hepatite ou AIDS. Caso alguma alteração seja encontrada e nós iremos encaminhar você para tratamento médico. Você deverá comparecer em jejum na Unidade de Pesquisa Clínica (UPC) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, localizada no 12º andar. Nós iremos coletar urina e sangue (cerca de 3 tubos pequenos) de uma veia do seu braço e pode haver a dor da picada e eventualmente, a formação de manchas roxas. Se os exames estiverem normais, você será chamado para uma segunda visita a UPC aonde você deverá comparecer em jejum. Nós iremos coletar amostras de sangue da veia do seu braço (cerca de 3 tubos com 5 mL) e urina (cerca de 50mL). Depois disso você será selecionado para fazer parte de um dos 2 grupos do estudo: grupo 1 será aquele que começará pelo tratamento com as doses crescentes do Extrato Padronizado da Própolis (EPP-AF), seguido pelo tratamento com Celecoxibe; grupo 2 iniciará com o tratamento com o Celecoxibe e depois será transferido para o tratamento com as doses crescentes do Extrato Padronizado da Própolis. Caso você seja selecionado para o grupo 1, receberá no mínimo 21 comprimidos do Extrato Padronizado da Própolis de 125mg. Você deverá tomar pela boca, por um período de 7 dias, 3 comprimidos por dia, sendo que um será às 7:00h da manhã, um às 15 horas e mais um às 23 horas, todos sempre com 200 ml de água (uma quantidade aproximada de água que se obtém em um copo tipo “americano”). No final do 7º dia de uso, você retornará em jejum para a Unidade de Pesquisa Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para a realização da coleta de sangue da veia do seu braço e de sua urina (sempre serão 3 tubos pequenos e uma amostra de urina de 50mL). Em seguida, você receberá no mínimo mais 42 comprimidos do Extrato Padronizado da Própolis. Desta vez você irá tomar 2 comprimidos de 125mg de 8 em 8 horas (3 vezes por dia, por 7 dias). Ao finalizar os sete dias, você retornará mais uma vez para a Unidade de Pesquisa Clínica em jejum para a coleta do seu sangue e de sua urina. Como última parte do estudo, você receberá 14 comprimidos de 200mg de Celecoxibe, sendo que cada comprimido deverá ser tomado de 12 em 12 horas, acompanhados de 200 ml de água por 7 dias. No final do 7º dia de uso, você deverá retornar a Unidade de Pesquisa Clínica em jejum para a coleta de sangue e urina, nas mesmas quantidades que você coletou na fase em que tomou a própolis. Caso você seja selecionado para o grupo 2, você receberá primeiramente os 14 comprimidos de 200mg de Celecoxibe e depois os comprimidos com doses diferentes da própolis. O protocolo de estudo será o mesmo, com retornos a UPC ao final de 7 dias de uso da própolis e do celecoxibe, a única mudança é a ordem em que a própolis será dado (antes ou depois do uso do celecoxibe). Caso você não possa comparecer na Unidade de Pesquisa Clínica na data correta do retorno, você deverá ligar para o pesquisador do estudo (Dr. Eduardo Barbosa Coelho, telefone 3602-2632) para ver se será possível reagendar a consulta.

Riscos:

O risco de participar deste estudo é mínimo. A própolis é usualmente utilizada como remédio e nenhuma reação adversa grave é conhecida com o uso popular do produto. O extrato de própolis que está contido nesse comprimido pode causar reações alérgicas em pessoas que apresentam histórico de picadas de abelhas e também com hipersensibilidade aos componentes desta formulação. Se houver algum sintoma de reação alérgica, você deverá procurar atendimento na Unidade de Pesquisa Clínica ou entrar em contato com o Dr. Eduardo Coelho. O Celecoxibe pode causar, em poucos casos, o aumento da pressão arterial, diarreia e dores de cabeça. Durante a coleta de sangue, algumas pessoas podem sentir fraqueza e até mesmo desmaiar por causa da punção. Também podem surgir hematomas e dor no local da picada. Entretanto, esses efeitos são passageiros e não são graves. A coleta de amostras será acompanhada por um médico que poderá atendê-lo no caso de alguma eventualidade, além de esclarecer qualquer dúvida.

Benefícios esperados

Para você o benefício em participar da pesquisa será o de ter uma consulta médica completa, com avaliações da função do fígado, rins, sangue e do coração. Como foi explicado acima nós não sabemos se a própolis tem efeito anti-inflamatório semelhante ao Celecoxibe. Conhecer esta informação irá permitir tornar o uso da própolis mais confiável, o que pode beneficiar todas as pessoas que no futuro forem utilizar a própolis como remédio.

Métodos alternativos existentes

Atualmente, não existem outros métodos que possam ser aplicados em estudo desse tipo. Este estudo é uma exigência da Agência de Vigilância Sanitária do Brasil (ANVISA) para que produtos de origem natural possam ser registrados como remédios. Este estudo segue as diretrizes dos órgãos internacionais de controle de medicamentos e é utilizado no desenvolvimento de novos medicamentos ao redor do mundo

Forma de acompanhamento e assistência

O ensaio será acompanhado por profissional médico capacitado a prestar assistência em caso de necessidade. Os pesquisadores estarão à sua disposição para quaisquer esclarecimentos nos telefones (16) 3602-2543 Prof. Dr. Eduardo Barbosa Coelho/Unidade de Pesquisa Clínica.

Garantia de sigilo

Na divulgação dos resultados da pesquisa, todos os voluntários serão identificados apenas por números, garantindo sua privacidade e a confidencialidade dos dados obtidos.

Ressarcimento de despesas

Você receberá ressarcimento financeiro para cobrir as despesas decorrentes de sua participação na pesquisa. O valor do ressarcimento é para a utilização com transporte e lanche, já que você deverá vir até o hospital em jejum. Para cada retorno de consulta médica você receberá R\$ 30,00. Assim, o valor total que será ressarcido para a sua participação na pesquisa será de R\$ 180,00 reais (6 visitas), desde que você cumpra todas as fases do projeto.

Indenização

Caso haja danos comprovadamente decorrentes da sua participação nesta pesquisa, você terá direito a indenização de acordo com a lei vigente.

Outros esclarecimentos

Você terá a garantia de receber respostas a qualquer pergunta ou dúvida que possa surgir, em qualquer etapa do estudo e também terá a liberdade de retirar seu consentimento e sair do estudo no momento em que desejar.

Consentimento Livre e Esclarecido

Após ter sido devidamente informado sobre a justificativa e objetivos da pesquisa e os procedimentos a que serei submetido, e receber a garantia de ser esclarecido sobre qualquer dúvida e de ter a liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento, consinto, de livre e espontânea vontade, em participar da pesquisa "Avaliação da eficácia e segurança clínica de anti-inflamatório de uso oral obtido a partir de princípio ativo da biodiversidade brasileira- Subprojeto 2: Avaliação de Eficácia do extrato de própolis como anti-inflamatório oral"

Data: ____/____/____

Voluntário

Prof. Dr. Eduardo Barbosa Coelho
Coordenador Clínico

Testemunha 1

Testemunha 2

ANEXO E – Artigo

Antioxidant effect of Standardized Extract of Propolis (EPP-AF®) in healthy volunteers.

Diniz, DP; Lorencini DA; Lia EN; Berretta, AA; Cintra MACT; Jordão A; Coelho EB.

Abstract

Propolis is rich in polyphenols, especially flavonoids and phenolic acids and has significant antioxidant activity, showed mainly in “in vitro” studies. The aim of this study was to evaluate the antioxidant efficacy of a standardized propolis extract (EPP-AF®) orally administered to healthy volunteers. 34 healthy participants (67.7% women, 30±8 years-old, 97% white) received two EPP-AF® doses (375 and 750 mg/d, P.O, trid) during 7±2 days, starting by the lower doses. Immediately before starting EPP-AF® administration and at the end of each dose, blood and urine samples were collected for quantification of GSH (reduced glutathione), GSSH (oxidized glutathione), SOD (superoxide dismutase), FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), vitamin E and MDA (malondialdehyde) in plasma and for 8-hidroxi-deoxi-guanosine (8-OHDG) and 8-isoprostanes (8-ISO) in urine. Lipid peroxidation decreased with both doses of EPP-AF® compared to baseline (8-ISO, 1.1 [0.9 – 1.3] vs. 0.85 [0.75 – 0.95] e 0.89 [0.74 – 1.0], ng/mg creatinine, P<0.05, for 375 and 750 mg/d EPP-AF® doses vs. baseline, mean and CI95%, respectively) and reduction of DNA oxidation with 750 mg/d doses (8-OHDG, 15.7 [13.2 – 18.1] vs. 11.6 [10.2 – 13.0], baseline vs. 750 mg/d, respectively, ng/mg creatinine, P<0.05. Reduction of oxidative stress damage was accompanied by increased plasma SOD concentration (1.4 [1.1 – 1.8] vs. 2.5 [1.6 – 3.0] e 2.6 [1.8 -3.3], U/L, P<0.0001 375 and 750 mg/d vs. baseline, median and interquartile range 25-75%, respectively) and by increased GSH for 375 mg/d EPP-AF® doses (1.23 [1.06 -1.34] vs. 1.33 [1.06 – 1.47], µmol/L, P<0.05). In conclusion, EPP-AF® reduced oxidative stress cell damage in healthy humans, with increased antioxidant enzymatic capacity, especially of SOD.

Keywords: propolis EPP-AF®, antioxidants, free radicals, oxidative stress, superoxide dismutase, clinical study

Introduction

Maintaining cell viability requires a continuous process of energy production, which is largely accomplished by mitochondria. In this process, reactive oxygen species are formed,

many of which participate in the control of cellular homeostasis, acting as biochemical intracellular signalling or even controlling gene expression. Under conditions of hypoxia, aging or cell damage, this respiratory chain may be decoupled, leading to the formation of reactive substances such as aldehydes, malondialdehydes (MDA), superoxides and peroxides, that in turn damage nucleic acids (DNA / RNA) and cellular membrane (HUSSAIN et al, 2016). Under physiological conditions, there is a balance between free radical production and its elimination. However, excess production of oxygen free radicals, defined as oxidative stress, can lead to cell damage and be part of a number of some chronic degenerative diseases observed in humans, such as, cancer, inflammatory and cardiovascular diseases, diabetes mellitus, atherosclerosis, Alzheimer's disease among others (FITZMAURICE, LAIRD & WARE 2011; ZHU et al. 2014). Antioxidant defences are composed of enzymatic mechanisms such as glutathione peroxidase (GPx), catalase, and superoxide dismutase (SOD) (DORNAS, 2008) and dozens of substances that play a role in binding and neutralizing free radicals. These substances may be endogenous (eg uric acid) or offered from diet or supplements (flavonoids, carotenoids, polyphenols, ascorbic acid, vitamin E, etc.) (PELUSO & SERAFINI, 2016; AHMADINEJAD et. Al, 2017 HUANG, 2018).

In the complementary medicine, the use of natural antioxidant-rich substances is frequent, mostly polyphenols (SERINO & SALAZAR, 2019; KUMAR & GOEL, 2019). Among the most abundant sources of polyphenols, especially flavonoids and phenolic acids, are propolis and wine (MEDIC-SARIC et al, 2009). Propolis is a complex phyto-compound made from resinous and balsamic material harvested by bees from flowers, branches, pollen and tree exudates (LUSTOSA et al, 2008). The chemical composition of propolis, besides flavonoids, also contains aromatic acids and esters, aldehydes and ketones, terpenoids and phenylpropanoids, steroids, amino acids, polysaccharides, hydrocarbons, fatty acids and inorganic components such as iron, calcium, manganese, aluminium, among others (LUSTOSA et al, 2008). However, the composition of propolis is very variable. It depends on the geographical region and the plants from which the bees extract its components. In Brazil, for example, there are 13 different types of propolis, including green, the most widely used, red and brown, whose main sources are *Baccharis dracunculifolia*, *Dalbergia ecastaphyllum* and *Hyptis divaricata*, respectively (KOCOT et. Al, 2018).

The antioxidant activity of the green propolis is correlated to the chemical composition of its different fractions, especially flavonoids and p-coumaric acid derivatives (Simões et. al. 2004). Most studies related to the antioxidant properties of propolis were performed in cell culture or in animals. In the available literature there are only a few studies investigating the antioxidant effect of propolis in humans (KOCOT et. Al, 2018). The available information about clinical trials are even more limited. The first clinical trial

using oral propolis for more than 30 days showed reduced free radical formation, lipid peroxidation and increased SOD activity (MEDIC-SARIC et. Al, 2009). However, this study showed antioxidant effect in men, but not in women.

One study in Chile, the oral use of a commercial propolis solution for 90 days showed reduced lipid peroxidation and increased concentration of reduced-glutathione (GSH) compared with baseline. In addition, there was also an increase in HDL concentration (MUJICA et. Al, 2017). In a study with type 2 diabetes mellitus (DM2) patients, the use of propolis increased the plasma concentration of GSH and reduced oxidation markers (ZHAO et. Al, 2016; AFSHARPOUR et. Al, 2019). However, these results were not observed in another study performed with Brazilian green propolis in diabetic patients (FUKUDA et. Al, 2015).

The standardized Extract of Propolis (EPP-AF®) was obtained by microencapsulation technology (Marquiafável et al. 2015) and has a chemical profile known and stable batch by batch, consisting mainly by caffeic acid, p-coumaric acid, cinnamic, aromadendrin, isosakuranetin and artepellin C (CASTRO et al. 2011), substances with important antioxidant effect *in vitro* (DANTAS SILVA et. Al, 2017). On the other hand, the bioavailability of polyphenols *in vivo* may be low, as some compounds have low absorption by the gastrointestinal tract or have extensive metabolism, reason why the microencapsulation was used as strategy, since this a good way of protection and improve in absorption (data not published yet). Considering that the use of antioxidant food supplements aims to prevent chronic diseases whose pathophysiological mechanism involves damage by free radical generation, the main objective of this study was to evaluate the antioxidant efficacy of Standardized Propolis Extract (EPP-AF®) for oral use in healthy volunteers.

Methods

Study design

The study design was two phase-sequential, open-label, non-randomized, before and after clinical trial.

Investigational Product

Coated EPP-AF® tablets (batch 190000116) were obtained by Apis Flora Indl. Coml. Ltda (Ribeirão Preto, SP/Brazil) using Propolis Standardized Extract EPP-AF® batch n. 189900116 (Marquiafável et al. 2015). EPP-AF® tablets offered 12 mg/tablet of Artepellin C by HPLC method (Berretta et al. 2012), 7.10 mg/tablet of total flavonoid as quercetin and gallic acid 19.49mg/tablet.

Participants

There were included participants from both genders, between 18 and 60 years old and weight varying 15% of what is considered normal for women and men, using Body mass index (BMI).

The inclusion criteria were healthy participant, no history of allergies, no continuous use of medication one week prior to the study and had read and signed the informed consent form (ICF).

The exclusion criteria were pregnant women, women breastfeeding, smokers and participants with history of alcohol or drug abuse.

Participants underwent physical examination, electrocardiogram and laboratory tests for renal function assessment (creatinine and urea), liver function assessment (transaminases and bilirubins), metabolic profile (fasting blood glucose and lipidogram), electrolytes and serologies for hepatitis B, C and HIV.

The study was approved by the Human Research Ethics Committee of the Clinical Hospital at Ribeirão Preto Medical School - University of São Paulo (HCFMRP-USP) (No. 5912/2012) and conducted at the Clinical Research Unit (UPC) of HCFMRP-USP. The study was registered in the Brazilian Registry of Clinical Trials (ReBEC, RBR-9zmfs9).

Research Protocol

After signing the ICF, collected and confirming the normal results in the clinical and biochemical assessment, the selected participants were invited to attend at UPC in 12-hour fasting. Blood and urine samples for oxidative stress markers were collected immediately before oral administration of EPP-AF®. These values were considered as baseline. Afterwards, the participants were instructed to use 375mg EPP-AF® per day, divided into 3 oral administrations for a period of 7 ± 2 days. At the end of this period, participants returned to UPC to repeat the above-mentioned blood and urine collection, clinical assessment, interrogation of adverse events and adherence to the treatment by counting the number of capsules taken during this period. Participants that took less than 80% of the intended propolis tablets were excluded from the study. Next, participants were instructed to use the EPP-AF® dose in 3 daily oral administrations for a period of 7 ± 2 days. Finally, they returned to the UPC for the same procedures used for the previous dose, and the study was closed. Blood and urine samples were centrifuged and stored at -80°C until study tests were performed.

Evaluation of antioxidant proteins and enzymatic activity

GSH, GSSG (oxidized glutathione) and SOD (superoxide dismutase),

Reduced and oxidized glutathione was determined in plasma according to Rahman et al., 2006. The assay is based on the reaction of GSH with 5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) which produces 5'-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB), which has a maximum absorbance at 412 nm and oxidized glutathione-TNB adduct (GS-TNB). Plasma samples (100µL) were placed in 5% metaphosphoric acid, centrifuged at 3000g at 4°C for 10min and the upper clear layer was maintained at 0-4°C during assay. 20µL of blank or standard sample were inserted into the reaction plate. The absorbance was measured at 412 nm in a microplate reader (SpectraMax M5, Molecular devices, USA). For the GSSG assay, 2 µL of 2-vinylpyridine was added to the formation of 100µL of 2-nitro-5-thiobenzoic acid in the plasma and the reaction was left for 2 hours in the dark. Then, 20µL were used for the plate reaction as described above. GSSG was calculated by the rate of formation of 2-nitro-5-thiobenzoic acid compared to the standard curve of GSSG. The reduced GSH was calculated as total values of glutathione - GSSG. For SOD determination, a commercial kit (Sigma-Aldrich, USA cat. No. 19160) was used according to the manufacturer's instructions and read at 450nm microplate reader (SpectraMax M5, Molecular devices, USA).

FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) quantification in Plasma:

The FRAP reagent was made by mixing the acetate buffer solution and the 10mM TPTZ solution (2,4,6-tripyridyl-s-triazine, Sigma, cat no. T1253-5G) with ferric chloride solution in 10:1:1 solution. 10µl of plasma were pipetted and 300 µl of FRAP solution were added. The plate was incubated on the spectrophotometer at 37°C for 4 minutes with reading at 593nm. Results were expressed as mM Fe²⁺ +

Dosage of vitamin E in plasma:

Vitamin E dosage was performed by high pressure liquid chromatography (HPLC), according the Arnaud et al. 1991. 200µL of plasma were pipetted into a test tube and 400µL hexane were added and stirred. In sequence 400µl heptane were placed. It was stirred for 1 min and centrifuged at 3000rpm/10min. Then a 200µL aliquot of the organic phase were taken, which was dried in N₂ flow (g) and suspended in 200µL of mobile phase. After sample was prepared, it was injected 20µL on HPLC. For the analyses, a Shimadzu (Japan) model LC-20AT chromatograph was used; column type C-18 (250 x 4.6mm - 5µm); UV-visible detector model SPD-20A; mobile phase composed of acetonitrile: dichloromethane: methanol 7:2:1; flow rate 1.0mL/min and detection at

292nm. Concentrations were determined using external standard and results were expressed in $\mu\text{mol/L}$ serum/plasma.

Plasma MDA Quantification

MDA formation was quantified by plasma colorimetric method. This analysis was performed according to the method proposed by Gerard-Monnier et al (1998), with some adaptations. 100 μL of plasma were added in 300 μL solution of 10mM of 1-methylphenylindole in acetonitrile and methanol (2: 1, v / v) and 75 μL of pure HCL (37%). Soon after, the Eppendorfs were vortexed and incubated in a water bath at 45°C for 40 minutes. After the bath, the samples were cooled on ice and then the Eppendorfs were centrifuged at 4000 rpm for 10 minutes. From the supernatant a 586 nm wavelength absorbance reading was performed (SpectraMax M5, Molecular devices, USA). MDA concentration was calculated by comparing it to a hydrolysed 1,1,3,3-tetramethoxypropane (TMP) curve.

8-hydroxy-deoxyguanosine (8-OHDG) and 8-isoprostane in urine (8-ISO)

Urine samples were centrifuged at 3500g for 5 minutes at 4°C. They were then diluted in milliQ water (1:50 to 1:250) and pipetted onto ELISA plates for 8-OHDG or 8-isoprostane according to the manufacturer's instructions (Cayman Chemical, USA). Readings were taken on a microplate reader (SpectraMax M5, Molecular devices, USA) and the dosages obtained corrected by urinary creatinine dosage performed in the clinical analysis laboratory of the University Hospital by automated method (Weiner, Argentina).

Sample Calculation

For sample size estimation, GPower 3.0 Software (Dusseldorf, Germany) was used. Urinary distribution data for 8-isoprostanes were based on Villa et al (2013) and for 8-OHDG on Wu et al (2004). For both outcomes, a sample of 34 participants demonstrated power of 0.80 to detect differences of at least 45% of baseline with P-value <0.05.

Data analysis

Data were described as mean or median, with respective standard deviation or interquartile variation. Data considered as normal distribution were analysed by repeated measures ANOVA followed by Dunnet post-test. Nonparametric distribution data were analysed by ANOVA for nonparametric repeated measures (Friedman) followed by Dunn's post-test. Correlation between plasma SOD and GSH concentrations with 8-ISO or 8-OHDG oxidative damage markers were made by Spearman test. It was considered as statistically

significant, P value <0.05. Data were analysed using GraphPad Prism Software version 7.0 (Graphpad Software, San Diego, CA, USA).

Results

Flowchart 1 describes the participants who were recruited and completed the research protocol. In total, thirty-seven participants were allocated in the study and 3 were excluded during the follow-up phase. One participant decided to withdraw he study protocol and two stopped EPP-AF® in the first week of use due to adverse events (headache and diarrhea). Both adverse events were limited, considered non serious by the investigator and potentially unrelated to EPP-AF®. The remaining 34 participants completed the study and had their data analysed. The mean age of participants was 30 ± 8 years, 67.7% were women and 97% self-reported as white.

Non-enzymatic systems

Baseline FRAP values (mmol/L), expressed as median and 25-75% interquartile range was 0.67 (0.61-0.83) and showed no differences after use of 375 mg/d EPP-AF® 0.68. (0.62-0.81) or 750 mg/d EPP-AF® 0.69 (0.63-0.87) ($p = 0.07$). Similarly, there was no effect of EPP-AF® on plasma vitamin E concentration expressed as median and 25-75% interquartile range. The values observed at baseline was 21 (18.3 - 25.3) $\mu\text{mol/L}$, remaining stable after the use of 375 m/d EPP-AF® 20.3 (16.7 - 24.5) $\mu\text{mol/L}$ and 750 mg/d EPP-AF® 20 (17.1 - 23.8) $\mu\text{mol/L}$ ($p = 0.09$).

Antioxidant proteins and Enzymatic Systems

Table 1 describes the antioxidant proteins and enzymatic systems studied (GSH, GSSG, GSH/GSSG ratio and SOD). There was a significant elevation in plasma GSH concentration at the 375mg/d EPP-AF® compared with baseline (Figure 2). SOD concentration also increased compared to baseline with the use of EPP-AF® 375 mg/d and 750 mg/d. There were no significant changes in the amounts of GSSG in the periods before and after the use of EPP-AF®, as well as in the GSH/GSSG ratio. SOD concentration, expressed as U/L, increased significantly with the use of EPP-AF® from baseline. The maximum effect observed was with the dose 375 mg/d. The elevation from the mean baseline was 78.6% for the 375 mg/d and 85.7% for the 750 mg/d EPP-AF®(Figure 1A). SOD concentration was correlated with urine 8-ISO values (r Spearman -0.20, $p = 0.03$, figure 1B), but not with 8-OHdG. There was no statistically significant correlation between GSH concentration and oxidative stress damage markers.

MDA, 8-ISO and 8-OHDG

There was a significant reduction in urinary excretion of 8-ISO with the use of EPP-AF®. Apparently, the maximum effect was observed at the dose of 375 mg/d, since increasing the dose was not accompanied by an increase in the magnitude of the effect. The difference from baseline mean concentration was -0.25 (-0.05 to -0.44) with EPP-AF® at a dosage of 375 mg/d and - 0.21 (-0.01 to -0.40) with EFF-AF® 750 mg/d (Figure 2). There was a reduction in urinary excretion of 8-OHDG only at the 750 mg/d EPP-AF® dose (Figure 3). There was no change in plasma MDA values (Table 2).

Discussion

The main findings of this study, conducted in healthy participants, was a reduction in the cellular membrane and DNA damage caused by free radicals, using the microencapsulated Standardized Extract of Brazilian green Propolis (EPP-AF®). This reduction in damage was associated with an increase in GSH concentration and more evident, with an increase SOD plasmatic concentration. The antioxidant effect of propolis is well known, mainly from *in vitro* studies in human cells. This activity is attributed mainly to the presence of flavonoids and polyphenols (Viuda-Martos, 2002), among them some caffeic and cinnamic acid derivatives (Matsushigue et al, 1996; Hayashi et al, 1999, Banskota et al, 2000). EPP-AF® presents, unlike other propolis presentations studied, high content of artepellin C, another agent with marked antioxidant activity (Zhang et al, 2017). In this study we showed the *in vivo* antioxidant effect of EPP-AF® in healthy young participants whose was expected low oxidation formation and preserved oxidative balance. These results are in line with other studies in humans with associated diseases, particularly T2DM, where increased GSH and SOD concentrations were observed (ZHAO et al, 2015; AFSHARPOUR et al, 2019) and in patients with dyslipidemia and cardiovascular risk, where an increase in HDL was observed (Mujica et al, 2017).

Propolis use has been associated with improved health conditions in which inflammation is a common denominator. In addition to the above-mentioned T2DM, there was an improvement in cognitive pattern in patients with Alzheimer's disease, associated with a reduction in inflammatory markers (Zhu et al, 2018). Clinical trials have shown the efficacy of propolis in the treatment of oral diseases associated to herpes virus- type I (Arenberger et al, 2017) and others, such as prosthetic stomatitis (Pina et al, 2017), recurrent cold sore (Samet et al, 2007) and periodontal disease, being shown in this last study the reduction of oxidative stress (Giammarinaro et al, 2018).

Regarding EPP-AF®, a clinical trial with chronic renal patients with proteinuria showed a reduction in inflammation markers and proteinuria intensity (Silveira et al, 2019). Thus, the present study shows that part of the anti-inflammatory mechanisms attributed to propolis may be associated with its antioxidant potential. Although this study was not intended to elucidate the potential anti-inflammatory effect of EPP-AF®, Inflammation and oxidative stress are interlinked processes, and metabolic and cardiovascular diseases have a low-intensity chronic inflammation state that may be related to the advancement of vascular disease and atherosclerosis processes (Baker et al, 2011; Forrester et al, 2018). Oxidative stress activates the inflammatory cascade via NF- κ B (nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells) and interestingly this pathway is inhibited by SOD overexpression (Chen et.al, 2013), which in our study showed a correlation with urinary 8-isoprostane excretion.

Most of the antioxidant effects were observed at a dose of 375 mg/d EPP-AF® (GSH elevation, increased SOD activity and reduced urinary 8-isoprostane formation). Reduction of DNA damage was observed only at higher doses. Part of this phenomenon may be associated with short treatment time (7 days) and low harm potential of participants (young and healthy). There is only one study in the literature with 8-OHdG quantification in humans after propolis use. In this study by Wu et al 2003, patients underwent colonoscopy and quantification of tumor markers for colon cancer were performed on biopsy samples in two groups previously receiving placebo or propolis. There was no benefit from propolis use for tumor markers and there was an increase in 8-OHdG concentration in patients receiving propolis (WU et. Al, 2003). This effect may have been caused by the preparation of colonoscopy, which used laxative agents that may have promoted cell damage. In this context, the present work shows that EPP-AF® at doses up to 750mg/d is safe and does not promote oxidative or toxic effects.

The main limitations of this study are in its design. As it was a “proof of concept” study, a “before and after” design was chosen. There was no blinding, randomization or placebo control, which may inflate the magnitude of the observed effect. Also, doses were elevated without a wash-out period and a cumulative dose effect may have occurred. Despite these limitations, the study's strengths are to use healthy young people at different dose exposures, with a set of biomarkers considered as the gold standard for detecting oxidative stress injury in humans and performed with a standardized presentation form of propolis.

In conclusion, the present study shows an important antioxidant effect of EPP-AF® in humans, associated with increased enzymatic protection capacity for redox damage. EPP-

AF® was well tolerated and safe in the doses used and can be used as a food antioxidant supplement.

Financing: The authors are grateful to Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP, grant number 01.12.0040.03), FAEPA (Fundação de Apoio, Ensino e Pesquisa do HCFMRP-USP) and CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento) for financial support. The authors thank Paula Payão Ovídio for technical assistance in FRAP, GSH, GSSG and MDA analysis.

References

Hussain T, Tan B, Yin Y, Blachier F, Tossou MCB, Rahu N. Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:1-9

Fitzmaurice GM, Laird NM, Ware JH. *Applied Longitudinal Analysis*. 2 ed. New York: John Wiley & Sons, 2011.

Zhu A, Zhou W, Zhong X, Ni J, Li Y, Meng J, Du C, Zhao X, Nakanishi H, Wu S. Brazilian Green Propolis Prevents Cognitive Decline into Mild Cognitive Impairment in Elderly People Living at High Altitude. *J Alzheimers Dis*. 2018;63:551-60

Dornas WC, et al. Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*. 2008;28:241-49.

Peluso I, Serafini M. Antioxidants from black and green tea : from dietary modulation of oxidative stress to pharmacological mechanisms. *Br J Pharmacol*. 2017;174:1195-208.

Ahmadinejad F, Møller SG, Hashemzadeh-Chaleshtori M, Bidkhorri G, Jami MS. Molecular mechanisms behind free radical scavengers function against oxidative stress. *Antioxidants*. 2017;6:1-15.

Huang D. Dietary Antioxidants and Health Promotion. *Antioxidants*. 2018;7:1-3.

Serino A, Salazar G. Protective role of polyphenols against vascular inflammation, aging and cardiovascular disease. *Nutrients* 2019;11:1-23.

Kumar N, Goel N. Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnol Reports* 2019;24:

Medic - saric M, Rastija V, Boji M, Maleš Ž. From functional food to medicinal product : Systematic approach in analysis of polyphenolics from propolis and wine. *Nutr J*. 2009;8:1-18.

Lustosa SR, Galindo AB, Nunes LCC, Randau KP, Rolim Neto PJ. Própolis: Atualizações sobre a química e a farmacologia. *Brazilian J Pharmacogn*. 2008;18:447-54.

Kocot J, Kiełczykowska M, Luchowska-kocot D, Kurzepa J, Musik I. Antioxidant Potential of Propolis , Bee Pollen , and Royal Jelly : Possible Medical Application. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018:1–29.

Simões LMC, Gregório LE, Silva Filho AA Da, Souza ML De, Azzolini AECS, Bastos JK, Lucisano-Valim YM. Effect of Brazilian green propolis on the production of reactive oxygen species by stimulated neutrophils. *J Ethnopharmacol*. 2004;94:59–65.

Mujica V, Orrego R, Pérez J, Romero P, Ovalle P, Zúñiga-hernández J, Arredondo M, Leiva E. The Role of Propolis in Oxidative Stress and Lipid Metabolism : A Randomized Controlled Trial. *Evidence-Based Complement Altern Med* 2017;2017:1–11.

Zhao L, Pu L, Wei J, Li J, Wu J, Xin Z, Goa W, Guo C. Brazilian Green Propolis Improves Antioxidant Function in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Int J Environ Res Public Health*. 2016;13:1–9.

Afsharpour F, Javadi M, Hashemipour S, Koushan Y, Khadem HH. Propolis supplementation improves glycemic and antioxidant status in patients with type 2 diabetes: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Complement Ther Med*. 2019;43: 283–88.

Fukuda T, Fukui M, Tanaka M, Senmaru T, Iwase H, Yamazaki M, Aoi M, Inui T, Nakamara N, Marunaka Y. Effect of Brazilian green propolis in patients with type 2 diabetes: A double-blind randomized placebo-controlled study. *Biomed Reports*. 2015;3:355–60.

De Castro PA, Savoldi M, Bonatto D, Barros MH, Goldman MH, Berretta AA, Goldman GH. Molecular Characterization of Propolis-Induced Cell Death in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell* 2011;10:398–411.

Silva RPD, Machado BAS, De Abreu Barreto G, Costa SS, Andrade LN, Amaral RG, Carvalho AA, Padilha FF, Barbosa JDV, Guez-Umsza MA Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts. *PLoS One* 2017;12:1–18.

Rahman I, Kode A, Biswas SK. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method *Nature Protocol* 2006;1:3159–65

Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem*. 1996 Jul 15;239 (1):70–6.

Arnaud J, Fortis I, Blachier S, Kia D, Favier. Simultaneous determination of retinol, α -tocopherol and β -carotene in serum by isocratic HPLC. *J. of Chromatogr*. 1991;572:103–116.

Gérard-Monnier D, Erdelmeier I, Régnard K, Moze-Henry N, Yadan JC, Chaudière J. Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4- hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chem Res Toxicol*. 1998;11:1176–83.

Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernández-López J, Pérez-Álvarez JA. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *J Food Sci.* 2008;73:117–24.

Matsushige, K., Basnet, P., Kadota, S., Namba, T. Potent free radical scavenging activity of dicaffeoyl quinic acid derivatives from propolis. *Journal of Traditional Medicines* 1996;13: 217–228.

Hayashi K, Komura S, Isaji N, Ohishi N, Yagi K. Isolation of Antioxidative Compounds from Brazilian Propolis: 3, 4-Dihydroxy-5-prenylcinnamic Acid, a Novel Potent Antioxidant. *Chem Pharm Bull.* 2002;47:1521–4.

Banskota AH, Tezuka Y, Adnyana IK, Midorikawa K, Matsushige K, Message D, Huertas AG, Kadota S. Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. *J Ethnopharmacol* 2000;72:239–46.

Zhang C, Shen X, Chen J, Jiang X, Hu FL. Identification of Free Radical Scavengers from Brazilian Green Propolis Using Off-Line HPLC-DPPH Assay and LC-MS. *J Food Sci.* 2017;82:1602–7.

Zhu W, Chen S, Li Z, Zhao X, Li W, Sun Y, et al. Effects and mechanisms of resveratrol on the amelioration of oxidative stress and hepatic steatosis in KKAY mice. *Nutr Metab (Lond).* 2014;11:1–11.

Arenberger P, Arenbergerova M, Hladíková M, Holcova S, Ottillinger B. Comparative Study with a Lip Balm Containing 0.5% Propolis Special Extract GH 2002 versus 5% Aciclovir Cream in Patients with Herpes Labialis in the Papular/Erythematous Stage: A Single-blind, Randomized, Two-arm Study. *Curr Ther Res - Clin Exp.* 2018;88:1–7.

Pina GMS, Lia EN, Berretta AA, Nascimento AP, Torres EC, Buszinski AFM, Campos TA, Coelho EB, Martins VP. Efficacy of Propolis on the Denture Stomatitis Treatment in Older Adults: A Multicentric Randomized Trial. *Evidence-based Complement Altern Med.* 2017;2017.

Samet N, Laurent C, Susarla SM, Samet-Rubinstein N. The effect of bee propolis on recurrent aphthous stomatitis: A pilot study. *Clin Oral Investig.* 2007;11:143–7.

Giammarinaro E, Marconcini S, Genovesi A, Poli G, Lorenzi C, Covani U. Propolis as an adjuvant to non-surgical periodontal treatment: A clinical study with salivary anti-oxidant capacity assessment. *Minerva Stomatol.* 2018;67:183–8.

Silveira MAD, Teles F, Berretta AA, Sanches TR, Rodrigues CE, Seguro AC, Andrade L.. Effects of Brazilian green propolis on proteinuria and renal function in patients with chronic kidney disease : a randomized ,. *BMC Nephrol.* 2019;20:1–12.

Baker RG, Hayden MS, Ghosh S. NF- κ B, inflammation and metabolic disease. *Cell Metab.* 2011;13:1–24.

Forrester SJ, Kikuchi DS, Hernandez MS, Xu Q, Griendling KK. Reactive oxygen species in metabolic and inflammatory signaling. *Circ Res* 2018;122:877–902.

Chen CJ, Fu YC, Yu W, Wang W. SIRT3 protects cardiomyocytes from oxidative stress-mediated cell death by activating NF- κ B. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;430:798–803.

Wu LL, Chiou C, Chang P, Wu JT. Urinary 8-OHDG : a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer , atherosclerosis and diabetics. *Clin Chim Acta*. 2004;339:1–9.