

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**ESTUDO DE GASTROPROTEÇÃO: POTENCIAL DO
EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA PRÓPOLIS
VERMELHA E DISCUSSÃO DE MODELOS
BIOLÓGICOS.**

MÁRCIO ANDRÉ ANDRADE MENDONÇA

ARACAJU
ABRIL – 2010

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**ESTUDO DE GASTROPROTEÇÃO: POTENCIAL DO
EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA PROPOLIS
VERMELHA E DISCUSSÃO DE MODELOS
BIOLÓGICOS.**

Dissertação de Mestrado
submetida à banca examinadora
como parte dos requisitos para a
obtenção do título de Mestre em
Saúde e Ambiente, na área de
concentração em Saúde e
Ambiente.

Orientadores
Juliana Cordeiro Cardoso, D.Sc.
Francisco Prado Reis, D.Sc.

ARACAJU
ABRIL – 2010

M539e Mendonça, Márcio André Andrade
Estudo de gastroproteção: potencial do extrato hidroalcoólico da própolis vermelha e discussão de modelos biológicos. / Márcio André Andrade Mendonça; Orientadores: Juliana Cordeiro Cardoso, Francisco Prado Reis. – Aracaju, 2013.

60p. : il
Inclui bibliografia.

Dissertação Mestrado (Saúde e Ambiente). – Universidade Tiradentes, 2013

1. Própolis vermelha. 2. Modelos biológicos. 3. Gastroproteção. I. Cardoso, Juliana Cordeiro. (orient.) II. Reis, Francisco Prado. (orient.) III. Universidade IV. Título.

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO Stricto sensu EM SAÚDE E AMBIENTE

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE DA UNIVERSIDADE TIRADENTES COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM SAÚDE E AMBIENTE

Aprovada por:

Juliana Cordeiro Cardoso. D. Sc.
Orientador

Francisco Prado Reis. D.Sc.
Orientador

Ricardo Luiz Cavalcante de Albuquerque Junior D.Sc.
Examinador

Maria José Fonseca Vieira D.Sc.
Examinadora

. Sonia Oliveira Lima D.Sc.
Suplente

Sara Maria Thomazzi D.Sc.
Suplente

ARACAJU
ABRIL – 2010

Dedico este trabalho a minha querida filha Mariana “*in memoriam*”

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado forças para enfrentar as turbulências pelas quais passamos nesta vida.

Agradeço incondicionalmente ao meu pai “Galego” e minha doce mamãe Ana Lucia. Essa vitória pertence a vocês.

Aos meus irmãos, Bruno, Fernanda e Matheus. Sem vocês a vida seria tremendamente monótona.

À minha amada esposa Giovanna, que sempre esteve me dando apoio irrestrito para a conclusão deste trabalho.

Aos meus filhos queridos, Beatriz, Arthur. O surgimento de vocês em minha vida foi um presente de Deus.

À minha vovó Maria e Iracema, por me apoiar em vários momentos, sobretudo quando realmente precisei.

Aos meus tios e tias Geraldo e Alberto, Rita, Meire, Nadja e Aninha *“in memoriam”*

Às minhas primas Luciana, e Silvana fonte de profunda admiração e respeito.

Ao professores Hesmoney e Ana Guedes, que me deram oportunidade de crescimento na instituição.

Aos colegas Malone Pinheiro (presidente), Caparran (Palmeirense), Sergio Oliveira, Ana Paula Barreto, Isamar Dantas. Obrigado pela convivência e troca de experiência.

A minha vizinha, colega e amiga, Wanessa Vivas. Obrigado mesmo.

Aos funcionários e técnicos dos laboratórios da UNIT, Genivaldo, Lins e principalmente Nely pois, com todo o trabalho me ajudou no momento crítico do trabalho.

À Ana Rosely, (mãe de Davi), pois, sem sua participação essa pesquisa não aconteceria. Muito obrigado e tenho certeza que seu futuro será brilhante.

Ao professor Ricardo Albuquerque, seu perfeccionismo é realmente incrível. Muito Obrigado por me ajudar nesta jornada.

Ao professor Francisco Prado, por ter me aceitado como orientando muito antes do início da confecção deste trabalho. Agradeço também ao professor Aderval Aragão.

Finalmente agradeço a minha orientadora Professora Juliana. Sua extraordinária dedicação ao trabalho foi indispensável para que pudesse concluí-lo. Serei eternamente grato.

A vida é como no esporte, não existem derrotas nem vitórias definitivas.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.	14
CAPÍTULO 1. REVISÃO DA LITERATURA	16
1. Produtos naturais: relação saúde, ambiente e sociedade..	16
2. Própolis: origem e propriedades biológicas	17
3 Lesões gástricas: epidemiologia, etiologia e fisiologia	19
4. Referências.	24
CAPÍTULO 2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GASTROPROTETORA DO EXTRATO DE PRÓPOLIS VERMELHA EM DIFERENTES MODELOS BIOLÓGICOS	
1. Introdução	30
2. Material e Métodos	31
2.1. Obtenção da própolis vermelha	31
2.2. Extração hidroalcoólica de própolis vermelha	31
2.3. Teor de flavonóides	31
2.4. Avaliação da ação gastroprotetora dos extratos de própolis vermelha	32
2.4.1. Animais	32
2.4.2. Ligadura de piloro	32
2.4.3. Indução de lesão gástrica usando AINEs como agente agressor.	32
2.4.4. Indução de lesão gástrica utilizando etanol absoluto como agente agressor	33
2.4.5. Método de cálculo de índice de lesões gástricas	33
2.4.6. Métodos histológicos	33
2.4.7. Análise estatística	34
3. Resultados e Discussão	34
3.1. Teor de flavonóides.	34
3.2. Modelo de Ligadura de piloro.	35

3.3. Induções de úlcera gástrica em ratos por etanol absoluto.	39
3.4. Indução de lesão gástrica em ratos por Indometacina.	43
3. Conclusão	45
4. Referências	45

CAPÍTULO 3. O MODELO DE ENSAIO BIOLÓGICO DE GASTROPROTEÇÃO POR LESÃO POR ETANOL: ESTUDOS DE VARIÁVEIS INDEPENDENTES.

1. Introdução	50
2. Material e Métodos	51
2.1 . Animais	51
2.2 .Ensaio farmacológico	51
2.3.Variáveis estudadas	51
2.4. Descrição das metodologias para cálculo do índice de lesão ulcerativa.	52
2.5 Métodos histológicos	52
2.6. Análise estatística	53
3. Resultados	54
4. Discussão	56
5. Conclusão	59
6. Referências	59
4. CONCLUSÃO GERAL	61
ANEXOS	62

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Tabela 1. Parâmetros bioquímicos do suco gástrico de ratos submetidos à ligadura do piloro, tratados por via intraduodenal.	36
Tabela 2. Efeitos da administração intraduodenal das amostras nos parâmetros bioquímicos de ratos submetidos à ligadura de piloro para determinação do muco.	38
Tabela 3. Efeito gastroprotetor do EHPV em modelo de indução de lesão gástrica por etanol em modelo animal de acordo com o EARP	39

Capítulo 3:

Tabela 1. Apresentação das variáveis estudadas para avaliar a influência destas nos estudos de gastroproteção	52
Tabela 2. Avaliação do ILU e da inibição de LU em relação a diferentes parâmetros, utilizando ratos machos e método de Gamberini et al. (1991) para cálculo do ILU	54
Tabela 3. Avaliação da atividade gastroprotetora utilizando diferentes métodos para obtenção do ILU	55
Tabela 4. Avaliação da área percentual lesada obtida através do software EARP e do índice de lesão ulcerativa (ILU) calculado pela fórmula matemática proposta por Szelenyi e Thiemer (1979)	55

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1.- Esquema de mecanismos envolvidos na secreção ácida gástrica 21

Capítulo 2

Figura 1.- Fotomicrografias dos estômagos de ratos submetidos ao protocolo de lesão gástrica por etanol absoluto 42

Figura 2. Fotomicrografias dos estômagos de ratos submetidos ao protocolo de lesão gástrica por indometacina. 44

Capítulo 3

Figura 1. Fotomicrografia das secções histológicas coradas em HE dos estômagos dos animais submetidos à agressão por etanol. (A) Tween 80 (B) Omeprazol. 55

ESTUDO DE GASTROPROTEÇÃO: POTENCIAL DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA PROPOLIS VERMELHA E DISCUSSÃO DE MODELOS BIOLÓGICOS.

Resumo

A própolis é um produto resultante da mistura de várias substâncias coletadas por abelhas. Apresenta uma composição química bastante complexa e variável, pois seus componentes dependem da flora de cada região. A variedade vermelha da própolis é encontrada com maior frequência na região Nordeste e tem sido alvo de diversos estudos sobre suas propriedades biológicas, entre elas a atividade gastroprotetora. O presente trabalho teve como objetivo estudar o potencial gastroprotetor do extrato hidroalcoólico da própolis vermelha (EHPV), sob condições de indução de lesão gástrica por diferentes modelos biológicos e discutir a influência das metodologias de obtenção dos índices de lesão na interpretação dos resultados obtidos. Os protocolos de indução de lesões administrando etanol absoluto e anti-inflamatório não esteroideal foram utilizados como modelos biológicos para avaliação do potencial gastroprotetor. A ligadura de piloro foi realizada para determinar a quantidade de secreção ácida e produção de muco. As metodologias usadas para caracterizar e calcular o índice de lesão gástrica foram comparadas sob o modelo de indução de lesão por etanol, utilizando modelos propostos por GAMBERINI et al. (1991), SZELENYI e THIEMER (1979) e BARROS et al. (2007). Parâmetros que podem influenciar os resultados também foram avaliados, como a interferência dos solventes (propilenoglicol e tween 80), os fármacos usados frequentemente como controle positivo (cimetidina e omeprazol) e as substâncias utilizadas como controle negativo (água, salina, propilenoglicol e tween 80). A dose de 500 mg.kg⁻¹ foi capaz de aumentar a produção de muco, não promoveu alteração de pH e protegeu efetivamente a mucosa da agressão realizada por etanol absoluto. Dentre as substâncias estudadas, o omeprazol foi o mais efetivo para gastroproteção e a água, salina e tween 80 mostraram-se inertes podendo ser utilizados como controle negativo no modelo estudado. O propilenoglicol apresentou sinergismo quando usado como solvente no EHPV. Os resultados encontrados demonstraram que o EHPV apresentou atividade gastroprotetora em todos os modelos testados para indução de lesão gástrica. A escolha da metodologia de cálculo para obtenção de índice de lesão pode produzir resultados diferentes comprometendo a avaliação gastroprotetora da substância testada.

Palavras chave: própolis vermelha, modelos biológicos, gastroproteção.

GASTROPROTECTIVE STUDY: POTENCIAL OF RED PROPOLIS HYDROALCOHOLIC EXTRACT AND DISCUSSION OF BIOLOGICALS MODELS.

Abstract

Propolis is a material that results from mixture of bee collected substances. It presents a diverse and complex chemical composition due the influence of regional plants. The red propolis is produced in Brazilian Northeast and some studies were carried out about its biological properties, included gastroprotective activity. The goal of this work was the study of gastroprotective role of red propolis hydroalcoholic extract (EHPV), using some biological models and discuss the influence of the methods to obtain the gastric damage index. The protocols of damage induction using ethanol and non steroidal anti-inflammatory drug were performed as biological models in order to evaluation the gastroprotective action. The pylorus ligation was carried out to determine the acid secretion volume and mucus production. The methodologies used to characterize the gastric damage index were compared under the ethanol model using the protocols of GAMBERINI et al. (1991), SZELENYI e THIEMER (1979) e BARROS et al. 2006. The interference of solvents (propylene glycol and tween 80), the drugs used as positive control (cimetidine and omeprazole) and substances as negative control (water, saline, propylene glycol and tween 80) was also studied. The doses of 500 mg.kg⁻¹ increased the mucus production, do not promote the pH alteration and protected the mucosa from ethanol aggression. The omeprazole was more effective than cimetidine as gastroprotector. The water, saline and tween 80 can be used as negative control due to show no mucosa protection. The results demonstrated that the EHPV showed gastroprotective activity under all studied models. The methodologies for determine gastric damage index can produce different results, altering the conclusions about the studied substance.

Key words: red propolis, biological models, gastroprotector

1. Introdução Geral

Os produtos naturais sempre foram alvo de muitos estudos. Os extratos e óleos essenciais obtidos de folhas e cascas das plantas são importantes opções terapêuticas usadas como alternativa aos fármacos tradicionais para tratamento de diversas doenças. Uma das atividades que produzem produtos naturais com essa finalidade é a apicultura, através da produção de mel, que atualmente vem sendo comercializado adicionado à própolis, limão, agrião e/ou romã.

A apicultura propicia geração de empregos de maneira regionalizada, produzindo um mercado que envolve o setor produtivo, transporte e de vendas. Esta atividade envolve aspectos sócio-econômicos, educacionais, ambientais e de saúde. Sem a preservação do ambiente natural das abelhas, caracterizada pelo pasto apícola, pode ocorrer uma diminuição da produção causando prejuízo para aqueles que estão envolvidos no processo. Desta forma, o produtor passa a ter uma consciência e conduta ecologicamente adequadas, preservando o habitat natural. Neste contexto, este setor produtivo apresenta-se como uma atividade sustentável sob o ponto de vista ambiental e social, uma vez que qualifica os produtores e dá oportunidade aos mesmos de ter a apicultura como fonte de renda e conhecimento do ambiente no qual estão inseridos. No setor da saúde, a atividade contribui significativamente, pois fornece produtos saudáveis para merenda escolar, como o mel, e produtos com atividade biológica importantes, a exemplo da própolis e do pólen.

A própolis é produzida pelas abelhas a partir do pasto apícola com a finalidade proteger a colméia de agentes agressores. Apresenta uma variabilidade de cor que está intimamente relacionada com as substâncias coletadas na região do pasto apícola. Este produto é rico em ácidos fenólicos e flavonóides que apresentam várias propriedades biológicas como atividades antioxidantes e anti-inflamatórias.

Uma variedade da própolis descoberta recentemente apresenta coloração avermelhada, que ocorre com maior frequência no Nordeste do Brasil, principalmente nos estados de Alagoas, Pernambuco e Sergipe. Porém, tem sido observado que mesmo tendo cor avermelhada semelhante, a própolis destas regiões podem apresentar origem botânica diferente. Segundo Daush (2007), a origem botânica da própolis vermelha produzida em Alagoas é a *Dalbergia ecastophillum*, porém esta não foi encontrada no estado de Sergipe, indicando que pode haver outro vegetal responsável pela produção desta variedade. Diante da escassez de informações sobre a própolis vermelha, diversos estudos estão sendo realizados para conhecer essas particularidades que envolvem suas propriedades biológicas, uma vez que a variedade

verde já apresenta vários estudos sobre estas propriedades, principalmente os mecanismos que envolvem a atividade gastroprotetora.

O estudo da atividade gastroprotetora envolve diversos modelos biológicos para avaliação pré-clínica de substâncias. Tais modelos buscam conhecer e explicar os mecanismos que estão relacionados à gastroproteção. Estes ensaios biológicos geralmente usam agentes que promovem lesões gástricas como o álcool absoluto e antiinflamatório não esteroidal. Porém, as metodologias utilizadas para caracterização da lesão gástrica e as substâncias utilizadas como controles positivo e negativo variam nos protocolos encontrados na literatura. A padronização destes protocolos deve ser objeto de estudo, uma vez que a depender da metodologia utilizada, um mesmo produto pode apresentar resultados divergentes.

Diante do exposto, o presente trabalho foi dividido em três capítulos sendo o primeiro destinado a revisão da bibliografia sobre o tema, o segundo, um artigo sobre a atividade gastroprotetora da própolis vermelha utilizando diferentes modelos biológicos e o terceiro um estudo sobre a influência de variáveis no modelo de caracterização de lesão gástrica induzidas por etanol absoluto.

CAPÍTULO 1 - REVISÃO DA LITERATURA

1. Produtos naturais: relação saúde, ambiente e sociedade.

O Brasil, com a grandeza de seu litoral, de sua flora e detentor da maior floresta equatorial e tropical úmida do planeta, apresenta forte vocação para o estudo de produtos naturais. Plantas, organismos marinhos, terrestres e alguns microrganismos fornecem uma diversidade de compostos bioativos (PINTO et al., 2002). Diante dessas circunstâncias, diversas pesquisas vem sendo realizadas na busca de informações sobre as propriedades biológicas destas substâncias encontradas nos produtos naturais. Plantas medicinais com atividades antimicrobiana, antiinflamatória e analgésica são comumente utilizadas pela população, muitas vezes com respaldo apenas em conhecimentos provenientes da cultura local de ancestrais, sem a devida comprovação científica (BELIZÁRIO-SOUSA, 2009).

Essas plantas com características farmacológicas são de grande importância no âmbito terapêutico, pois, proporcionam uma alternativa aos medicamentos alopáticos que se caracterizam por causar reações adversas e indesejadas ao usuário. O estudo destas substâncias de origem vegetal pode comprovar ou não sua eficácia e estabelecer doses e toxicidade de seus componentes, tornando-os próprios para serem utilizados como medicamento, estabelecendo assim a fitoterapia (BRASIL, 2004).

Medicamentos fitoterápicos são produzidos exclusivamente a partir de plantas, sendo regulamentados pela Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) 48/2004. Esta RDC determina aspectos em relação à identificação botânica das espécies vegetais utilizadas, padrão de qualidade, identidade, prova de eficácia e segurança que valide as indicações terapêuticas propostas (BRASIL, 2004).

Em 2006 através da Portaria nº 971, foi definida uma Política Pública Nacional sobre as Plantas Medicinais e Fitoterápicos, denominada de Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde (SUS). Neste documento, o governo federal incentiva o uso dos medicamentos naturais em todos os municípios brasileiros e coloca à disposição das prefeituras uma verba específica para a compra de medicamentos fitoterápicos que fazem parte da lista de atenção básica à saúde e distribuídos à população através do SUS. Os medicamentos produzidos com 'guaco' e 'espinheira-santa' já se encontram disponíveis no programa e em 2010 serão incluídos na relação oferecida à população, medicamentos produzidos a partir da

alcachofra, aroeira, cáscara-sagrada, garra-do-diabo, isoflavona da soja e unha-de-gato (BRASIL, 2006). Com isso torna-se imprescindível um maior conhecimento científico em relação aos produtos naturais produzidos no país, uma vez que a maioria das indicações terapêuticas é pautada no conhecimento popular.

Além de produtos de origem vegetal, o Brasil conta também com a produção de apiterápicos. A apicultura é uma atividade em expansão no país, que se caracteriza por criação de abelhas com produção de mel, pólen, própolis, apitoxina e geléia real. A atividade apiculturista agrega vários benefícios aos indivíduos que estão envolvidos no processo. Na dimensão social, a apicultura contribui na geração de empregos e conseqüente melhoria socioeconômica das populações de baixo poder aquisitivo, como também transforma o legado extrativista em uma atividade produtiva e ecologicamente consciente. Outra vantagem social da apicultura é que ela pode ser incorporada às pequenas propriedades sendo adaptável a outras atividades, diversificando os trabalhos em uma propriedade familiar na obtenção de uma fonte alternativa de renda (WOLF et al., 2009).

Dos produtos originados da apicultura, o mel é o principal produto comercializado. Segundo Costa (2009), a China é um dos maiores produtores de mel do mundo representando 21,12% da produção em 2004, seguida dos Estados Unidos e Argentina com 6,28% e 6,12%, respectivamente. O Brasil está na décima quinta posição com 24.000 toneladas, representando 1,88% da produção mundial. Em relação à atividade terapêutica, as abelhas produzem a própolis, que já vem sendo estudada e utilizada pela população para o tratamento de diversas afecções.

2. Própolis: origem e propriedades biológicas

A palavra própolis é derivada do grego *pro-*, em defesa, e *polis-*, cidade ou comunidade, isto é, significa em defesa da comunidade. De modo geral contém 50 - 60% de resinas e bálsamos, 30 - 40% de ceras, 5 - 10% de óleos essenciais, 5% de grão de pólen, além de microelementos como alumínio, cálcio, estrôncio, ferro, cobre, manganês e pequenas quantidades de vitaminas B1, B2, B6, C e E (LUSTOSA et al., 2008). Este material é responsável, nas colméias, pela impermeabilização, isolamento térmico, vedação e tratamento antisséptico.

Existem diversos produtos contendo própolis, comercializados em todo mundo, principalmente no Japão, tais como xampus, tinturas, loção anti-acne, cremes faciais, pomadas, soluções anti-sépticas, spray bucal, pastas de dente, pastilhas, balas,

chocolates, gomas de mascar, doces, entre outros (PARK et al., 1998; MANARA et al., 1999; VARGAS et al., 2004).

No Brasil a colheita de própolis pode ocorrer durante todo o ano, contudo, sua composição e atividade podem variar a depender da região onde a própolis foi produzida e aspectos sazonais (DAUGSCH, 2007, SILVA et al., 2006). Mesmo assim, na medicina popular, tem sido usada de forma empírica, desde os tempos antigos, em muitas partes do mundo devido suas atividades antimicrobiana, antiinflamatória, cicatrizante, anestésica, antioxidante, anti-cancerígena e também como gastroprotetora (BARROS et al., 2007, MAIA-ARAUJO, 2009, PINHEIRO, 2009) .

A variação das atividades biológicas da própolis é maior em áreas tropicais, refletindo a diversidade vegetal destas regiões. A própolis brasileira foi classificada em 12 grupos distintos, de acordo com a sua cor, composição química e atividades biológicas. Atualmente um novo tipo de própolis proveniente da região de mangue do Estado de Alagoas teve sua origem botânica identificada como *Dalbergia ecastophyllum*, uma espécie de leguminosa, surgindo então uma nova variedade, classificada como própolis vermelha (DAUGSCH, 2007; CABRAL et al., 2009).

A própolis vermelha ainda é pouco explorada cientificamente, sendo encontrados alguns trabalhos sobre a origem botânica (DAUSCH, 2007), composição química (TRUSHEVA, 2006), além de algumas propriedades biológicas tais como a ação antimicrobiana (BITTENCOURT, 2008; SIQUEIRA, 2008; ARAUJO, 2009, PINHEIRO, 2009), ação cicatrizante (SOUZA, et al., 2009) e atividade gastroprotetora (PINHEIRO, 2009).

A própolis de maneira geral possui em sua composição os flavonóides (ou bioflavonóides) que são substâncias polifenólicas amplamente encontradas na natureza, em frutas, folhas, flores, raízes, madeiras, cascas, pólen, néctar, sementes e grãos. Os flavonóides são responsáveis por funções biológicas que garantem o equilíbrio ecológico, como proteção contra a radiação ultravioleta, regulação do crescimento e desenvolvimento normal das plantas, defesa contra fungos, bactérias e vírus, além de reduzirem os agentes oxidativos lesivos à própria planta. Estão ainda envolvidos no processo de transferência de energia, morfogênese, determinação do sexo das plantas, respiração e fotossíntese da maioria das plantas (ZUANAZZI, 1999; COOK e SAMMAN, 1996; DI CARLO et al., 1999; HARBONE e WILLIAM, 2000; BURIOL et al., 2009).

Os efeitos benéficos dos flavonóides estão, em parte, associados à sua atividade antioxidante, que inclui sequestro de radicais livres, para prevenir a sua propagação, hidrólise enzimática da ligação éster para remover ácidos graxos

peroxidados de lipídeos, sequestro de íons metálicos de transição e redução de enzimas catalisadoras de peróxidos (ANDREOLI, 2000).

Certos flavonóides ou compostos com propriedades semelhantes aos flavonóides têm apresentado atividade antiulcerogênica e previnem lesões da mucosa gástrica produzidas por vários métodos de indução de úlcera. Entre os inúmeros flavonóides já estudados, alguns são descritos como capazes de exercer atividade antiulcerogênica, entre eles destacam-se a rutina, narigina, quercetina, kaempferol, sofaradina e luteolina (LEWIS, 1991; DI CARLO et al., 1999; HARBONE e WILLIAM, 2000; BORRELLI e IZZO, 2000). A ação gastroprotetora dos flavonóides naturais, de forma geral, pode ser mediada através da estimulação da secreção de muco e bicarbonato (CRISTONI et al., 1989; GRACIOSO et al., 2002) ou por um efeito inibitório direto na bomba de prótons das células parietais (BEIL et al., 1995).

3. Lesões gástricas: aspectos epidemiológicos, fisiológicos, etiológicos e farmacológicos.

As úlceras pépticas são doenças caracterizadas por lesões ulcerosas agudas ou crônicas que, na maioria das vezes, aparecem em qualquer porção do trato gastrointestinal exposta à ação agressiva do suco ácido-péptico (CALAM e BARON, 2001).

Estas doenças são geralmente atribuídas ou associadas a danos causados na mucosa gástrica que por sua vez atinge uma grande parcela da população, constituindo um agravo provocado por inúmeros fatores desencadeantes com uma sintomatologia ligada aos reflexos orgânicos mais comuns como: dores estomacais, náuseas, hemorragias, entre outras. A úlcera péptica é um termo convenientemente utilizado para se referir na maioria das vezes às úlceras gástricas e duodenais. Esse tipo de lesão leva à necrose que acomete toda a superfície da mucosa gástrica e também a camada muscular (HALTER et al., 1995; FERREIRA, 2005; VINAGRE, 2005).

Sua prevalência, segundo Vinagre (2005) e Ferreira (2005), é de 8 a 10% da população dos países industrializados, sendo 11 a 20% homens e de 8 a 11% mulheres e que esta diferença na incidência desta patologia no sexo masculino possa ser devido à estressante jornada de trabalho, hábitos alimentares, uso contínuo de café, álcool e tabaco, os quais são fatores predisponentes para redução da defesa da mucosa gástrica.

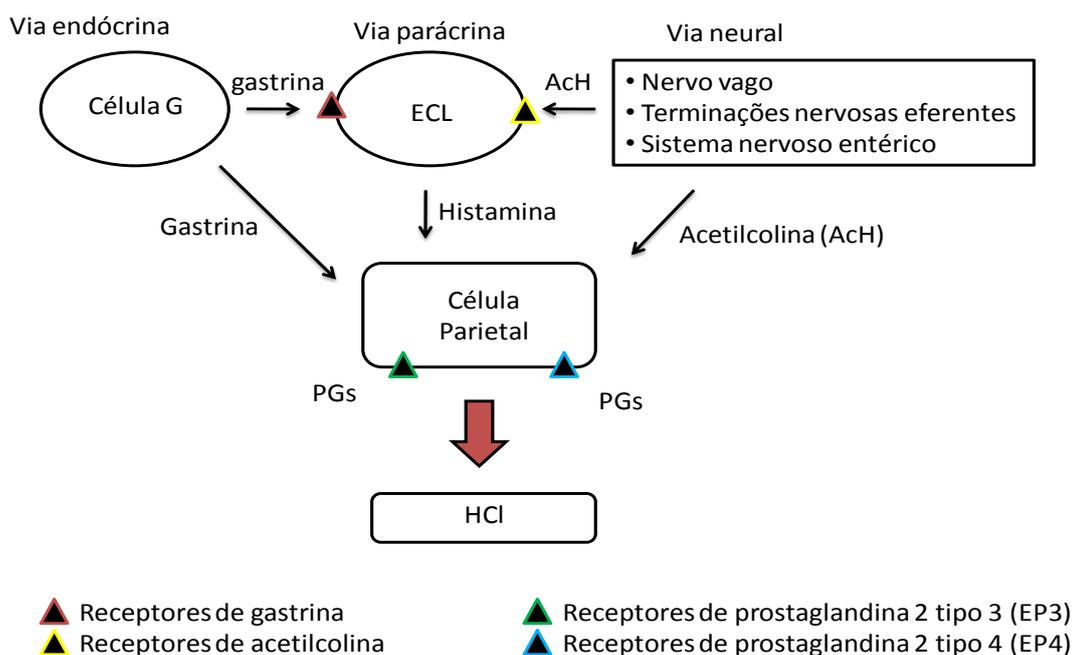
De acordo com D'Acampora et al. (2008), a perfuração da úlcera péptica está presente em 1 a 6% dos casos e aparece em segundo lugar como causa de abdome agudo inflamatório, mas apesar de ser uma doença frequente, não se conhece sua real incidência no Brasil. Contudo, para Saul et al. (2007), a prevalência da úlcera difere ao redor do mundo, sendo as de caráter duodenal predominando nos países ocidentais e as gástricas mais freqüentes na Ásia, especialmente no Japão.

Trata-se, portanto, de um dos principais problemas de saúde no mundo, sendo responsável por grandes perdas econômicas e gastos com saúde devido à baixa produtividade do trabalhador, e das atividades diárias, aumento de visitas médicas e hospitalizações (GRAHAM et al., 1991; LOEB et al., 1992, FERREIRA, 2005; VINAGRE, 2005).

A anatomia e fisiologia gástrica são importantes para o entendimento da ocorrência das lesões. O estômago, um dos segmentos proximais do trato gastrointestinal (TGI) é circundado por várias camadas de músculo liso, revestido por uma mucosa, e dividido em quatro regiões anatômicas: cárdia, fundo, corpo e antro. Este órgão possui depressões e glândulas em toda sua extensão, sendo formado por células epiteliais secretoras de muco, células parietais secretoras de ácido, células principais secretoras de pepsinogênio, enterocromafins (ECL) e células G, produtoras de gastrina (VINAGRE, 2005).

As células principais (produtoras de pepsinogênio) e parietais estão localizadas primariamente no fundo e no corpo, enquanto que as células produtoras de gastrina encontram-se no antro (KONTUREK et al., 2004).

As células parietais secretam ácido por três vias: parácrina, quando estimuladas pela histamina produzida pela ECL; endócrina, estimuladas pela gastrina produzida pelas células G do antro; e neural, estimuladas pela acetilcolina liberada nas terminações nervosas eferentes do nervo vago e do sistema nervoso entérico. Histamina, gastrina e acetilcolina possuem seus respectivos receptores localizados na membrana basolateral das células parietais. A gastrina e acetilcolina têm receptores na membrana das células ECL e também estimulam a secreção ácida indiretamente, através da liberação de histamina. Portanto, as células parietais são as principais células secretoras de ácido na mucosa gástrica, regulada por mecanismos neurais, hormonais, parácrinos e autócrinos em níveis central e periférico, sendo o mecanismo central o mais importante deles (VINAGRE, 2005; MAYER, 2007). Todos estes mecanismos estão esquematizados na figura 1.



O primeiro nível de defesa do estômago consiste de fatores secretados no lúmen incluindo ácido gástrico, bicarbonato, muco, imunoglobulinas e outras substâncias antibacterianas. O suco gástrico normal é uma mistura da secreção parietal (ácido e fator intrínseco) e não parietal (muco, bicarbonato, Na⁺, K⁺ e pepsinogênio). (MAYER, 2007).

O trato gastrointestinal é frequentemente exposto a estímulos nocivos que podem causar lesões. Estes estímulos podem ser os anti-inflamatórios não esteroidais, álcool, alimentos em várias temperaturas, infecções por *Helicobacter pylori*, lesões relacionadas à isquemia/reperfusão e fatores endógenos como a produção fisiológica de ácido gástrico ou alterações de mucosa provocadas por estresse (WALLACE, 2001).

O muco apresenta um importante papel na prevenção da agressão mecânica ao epitélio, pois forma uma barreira de proteção prevenindo colonização bacteriana (WALLACE, 2001). Este agente protetor é regulado pela síntese de prostaglandinas, sendo reduzido por anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), aumentando assim a susceptibilidade da mucosa à lesão. Os AINEs também são responsáveis pela diminuição de secreção do bicarbonato. Em experimentos pré-clínicos, comumente é realizada uma intervenção cirúrgica com a finalidade de causar um aumento do conteúdo gástrico por secreção ácida, chamada de ligadura de piloro. Esse bloqueio

do estômago com o duodeno dispara mecanismos de secreção ácida pelo sistema vago-vagal alterando a concentração e a produção dos fatores protetores como o muco e bicarbonato (SHAY et al., 1945; LEWIS E HANSON, 1991, VINAGRE, 2005).

O epitélio gástrico humano contribui sensivelmente na proteção gástrica, pois, possui um ciclo de renovação celular de cerca de 2 a 4 dias, ou seja, a cada 3 dias todo o epitélio gástrico é renovado, mesmo que essas células estejam íntegras o que ajuda a manter sempre as suas funções como uma barreira ao ácido gástrico e a outros agressores (WOLFE, 2000).

A microcirculação exerce também um importante papel na proteção contra danos à barreira de muco do estômago aumentando o fornecimento de nutrientes e oxigênio ao epitélio. Além disso, remove, dilui e neutraliza substâncias tóxicas que se difundem do lúmen para a mucosa, portanto, a diminuição da perfusão sanguínea da mucosa gástrica resulta em formação de erosões e úlceras (KWIECIEN et al., 2002).

As prostaglandinas são derivadas de ácidos graxos compostos por 20 carbonos, encontradas em todos os tecidos e órgãos e estão envolvidas em uma variedade de funções fisiológicas e patológicas. São sintetizadas a partir de diferentes ácidos graxos essenciais, entre eles, o ácido araquidônico (AA). Têm efeito na motilidade, secreção e citoproteção do trato gastrointestinal. As prostaglandinas E₂ (PGE₂), podem influenciar de duas maneiras a secreção ácida gástrica. Em baixas concentrações inibem a secreção ácida através da interação com receptores de prostaglandinas E tipo 3 (EP3) e em concentrações maiores estimulam a secreção ácida através da interação com receptores de prostaglandinas E tipo 4 (EP4). Ambos estão presentes nas células parietais e nas células principais da mucosa gástrica. Além disso, possuem efeito estimulatório na secreção de bicarbonato e muco (BRZOWSKI et al., 2005).

Todos estes mecanismos de proteção podem ser comprometidos por fatores que condicionam o surgimento de lesões teciduais desencadeados por agentes externos como o uso crônico de etanol que degrada a camada de muco e bicarbonato provocando estresse celular, liberando substâncias oxidantes (radicais livres), causando apoptose (OATES et al., 1988; SUN et al., 1991).

Portanto, vários mecanismos estão implicados na patogênese das lesões gástricas, agindo sinergicamente ou não na produção das lesões. Assim, o aumento da secreção ácida gástrica, pepsina, diminuição do fluxo sanguíneo, supressão de prostaglandinas endógena, inibição do crescimento e proliferação celular da mucosa, alteração da motilidade gástrica, presença de agentes infecciosos e presença de radicais livres são alguns dos mecanismos envolvidos na ulcerogênese (WOLFE e

SOLL, 1988; LEWIS e HANSON, 1991; HIRSCHOWITZ et al., 1995; WOLFE e SANCHS, 2000; ANDREOLI, 2000).

Os medicamentos atualmente utilizados como gastroprotetores interferem diretamente em algum dos mecanismos acima descritos. Os principais medicamentos utilizados no controle da hipersecreção gástrica são os antagonistas de receptores H_2 de histamina e os bloqueadores da bomba de prótons. Os anti H_2 inibem a produção ácida por competirem de modo reversível com a histamina pela ligação aos receptores H_2 na membrana basolateral das células parietais. Na prática clínica, os mais utilizados são a cimetidina, ranitidina, famotidina e a nizatidina (VINAGRE, 2005).

Os fármacos que inibem a bomba H^+ , K^+ - ATPase (bomba de prótons) omeprazol, lansoprazol, rabeprazol e pantoprazol são considerados, atualmente os fármacos mais eficazes na supressão da secreção de ácido gástrico (GILMAN et al., 2007).

Estes medicamentos por serem bases fracas, acumulam-se nos canalículos secretórios destas onde são ativados por um processo de prótons catalisados resultando na formação de uma sulfonamida tiofílica ou ácido sulfênico. Esta forma ativada reage por ligação covalente com o grupo sulfidril da cisteína 813 de domínio extracelular da enzima H^+ , K^+ ATP-ase ocorrendo a inibição da secreção do ácido clorídrico (HCl), portanto, esta ligação irreversível à enzima da célula parietal gástrica, inibe a produção de HCl. (TWARDOWSCHY, 2007)

Vale ressaltar que a biodisponibilidade do omeprazol é baixa, mesmo sendo considerado o mais eficaz no tratamento de lesões gástricas, porém, a sua ação segundo MacAllister (1999), é dependente tanto da dose quanto do tempo de administração. Segundo Belizário-Souza (2009), geralmente este tipo de tratamento realizado de forma sistemática e de longa duração torna os efeitos acumulativos do fármaco capaz de gerar reações adversas.

A carbenoxolona é um derivado do ácido glicirrízico, que atua aumentando produção de muco protegendo o tecido contra a ação do HCl. Apesar disso ainda é menos eficiente que os demais fármacos já citados e que apresentam efeito citoprotetor (GILMAN et al., 2007).

Diversos produtos naturais têm sido avaliados como necessidade de se buscar novos medicamentos efetivos para o tratamento da lesão gástrica tem sido levantada porque os medicamentos sintéticos como o omeprazol que se liga de maneira irreversível aos receptores, deixa-os indisponíveis até que ocorra o *turn over* celular (ZUANAZZI, 1999).

Os compostos obtidos de plantas com atividade antiulcerogênica apresentam estruturas químicas diversas e distintos mecanismos de ação. Dentre as principais classes de compostos relacionados a essa atividade têm-se os terpenos, triterpenos, flavonóides, alcalóides, glicosídeos, saponinas e polissacarídeos (LEWIS e HANSON, 1991). Substâncias com atividade antiulcerogênica, obtidas a partir de plantas, exercem seus efeitos estimulando os fatores de proteção da mucosa gástrica, aumentando a síntese de prostaglandina (PG) e/ou estimulando a secreção de muco e bicarbonato, ou ainda inibindo a secreção ácida (LEWIS e SHAW, 2001; BORRELL e IZZO, 2000; BEIL et al., 1995).

A própolis verde, que possui compostos fenólicos já elucidados, apresentou 88% de inibição em lesões provocados por etanol (BARROS et al., 2007). Estes resultados sugerem que outras variedades também podem apresentar resultados semelhantes, como é o caso da variedade vermelha.

4) Referências

ALBUQUERQUE JÚNIOR, R.L.C.; BARRETO, A.L.S.; PIRES, J.A.; REIS, F.P.; LIMA, S.O.; RIBEIRO, M.A.G.; CARDOSO, J.C. Effect of bovine type-I collagen-based films containing red propolis on dermal wound healing in rodent model. **International Journal of Morphology**, v.27, p.1105-1110, 2009.

ANDREOLI, T.E. Free radicals and oxidative stress. **American Journal Medicine**, v. 108, p. 650-651, 2000.

BARROS, M.P.; SOUSA, J.P.B.S; BASTOS, J.K; ANDRADE, S.F. Effect of Brazilian green propolis on experimental gastric ulcers in rats. **Journal of Ethnopharmacology** 110, 567–571, 2007.

BEIL, W.; BIRKHOLZ, C.; SEWING, K-FR. Effects of flavonoids on parietal cell acid secretion, gastric mucosal prostaglandin production and *Helicobacter pylori* growth. **Drug Research**, v. 45, n.1, p. 697-700, 1995.

BELIZÁRIO-SOUZA, A.P. **Avaliação da efetividade de medicamentos homeopáticos em ensaios biológicos de gastroproteção e cicatrização por segunda intenção**, Dissertação de Mestrado, UNIT. ARACAJU, SE. BRASIL 2009.

BITTENCOURT, F. O. **Desenvolvimento e avaliação da atividade antimicrobiana contra *Candida albicans* de formulações semi-sólidas contendo própolis vermelha**. Dissertação de Mestrado, UNIT. ARACAJU, SE. BRASIL.2008.

BORRELL, F.; IZZO, A.A. Review article: The plant Kingdom as a source of anti-ulcer remedies. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 581-591, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Resolução de Diretoria Colegiada no. 48 de 16 de março de 2004*. Aprova o regulamento técnico de medicamentos fitoterápicos junto ao Sistema Nacional de Vigilância Sanitária. DOU. Diário Oficial da União, Poder Executivo, DF, Brasília, 18 mar. 2004.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. 1 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

BURIOL L; FINGER, D; SCHMIDT, E.M.; SANTOS J.M.T.S; ROSA, M.R; QUINÁIA, S.P; TORRES, Y.R; **Composição química e atividade biológica de extrato oleoso de própolis: uma alternativa ao extrato etanólico**. Quim. Nova, vol. 32, No. 2, 296-302, 2009.

CALAM, J.; BARON, J.H. Pathophysiology of duodenal and gastric ulcer and gastric cancer. **Brit. Med. J.**, v. 323, p. 980-983, 2001.

COOK, N. C.; SAMMAN, S. Review article: Flavonoids-Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **J. Nutri. Biochem.**, v. 7, p. 66-76, 1996.

COSTA; C. P.M.; DE FREITAS. F.R.D. **A produção de mel de abelha (apis mellifera) no município de jardim: um estudo de caso**. Cadernos de cultura e ciência. Ano IV - Vol. 1- Nº 1, 2009.

CRISTONI, A.; MALANDRINO, S.; MAGISTRETTI, M.J. Effect of a natural flavonoid on gastric mucosal barrier. **Drug Reserach**, v. 39, n. 1, p. 590-592, 1989.

D'ACAMPORA JA, LIMA D.A.N., SOUSA M.V., AQUINO A.C., RUSSI R.F, VIEIRA J, LOPES A. Perfil epidemiológico dos pacientes portadores de úlcera péptica perforada atendidos no centro cirúrgico do Hospital Florianópolis. **Rev. Med Res** 2008; 10(4):141-146.

DAUGSCH. A. **A própolis vermelha do Nordeste do Brasil e suas características químicas e biológicas**. Dissertação de Mestrado. UNICAMP. Campinas/SP, 2007.

DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A. A.; CAPASSO, F. Review article: Flavonoids Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Science**, v. 65, n. 4, p. 337- 353, 1999.

FERREIRA, A.L. **Atividade Antiulcerogênica da espécie *Anacardium humile* St. Hil. (Anacardiaceae)**. Dissertação de Mestrado – UNICAMP, Campinas-SP, 2005.

GAMBERINI, M. T.; SKORUPA, L. A.; SOUCCAR C.; LAPA, A.J. **Inhibition of gastric secretion by a water extract from *Baccharis triptera*, Mart.** *Mem Inst Oswaldo Cruz*. v. 86: p.137-139,1991.

GILMAN. A. G.; HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. Goodman & Gilman. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**, Rio de Janeiro: Guanabara, 11Ed, 2007.

GUIMARÃES, E. V.; MARGUET, C.; CAMARGOS, P. A. M. Tratamento da doença do refluxo gastroesofágico, *Jornal de Pediatria*, 82(5), p. s133-s145 2006.

GRACIOSO, J. S.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C. A.; SOUSA BRITO, A. R. M. Effects of tea from *Turnera ulmifolia* L. on mouse gastric mucosa support the Turneraceae as a new source of antiulcerogenic drugs. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**. v. 25, n. 4, p. 487-491, 2002.

HALTER, F.; SCHMASSMANN, A.; TARNAWSKI, A. Review article: healing of experimental gastric ulcers. Interference by gastric acid. **Digestive diseases and sciences**, v. 40, n. 11, p. 2481-2486, 1995.

HARBONE, J. F.; WILLIAMS, C. A. Review: Advances in flavonoid research since. **Phytochemistry**, v. 55, p. 481-504, 2000.

HIRSCHOWITZ, B. I.; KEELING, D.; LEWIN, M.; OKABE, S.; PARSONS, M.; SEWING, K.; WALLMARK, B.; SACHS, G. Pharmacological aspects of acid secretion. **Digestive diseases and sciences**, v. 40, n. 2, p. 3s-23s, 1995.

JOHNSON, B; JOHNSON, L. R. Regulation Peptides of the Gastrointestinal Tract. In: **Gastrointestinal Physiology** Ed. LEONARD R. JOHNSON. St. Louis: Mosby, p. 14, 1997.

KONTUREK PC, KONTUREK SJ, OCHMANSKI W. Neuroendocrinology of gastric H+ and duodenal HCO₃⁻ secretion: the role of brain-gut axis. **Eur J Pharmacol**, v. 19, pg.15-27, 2004.

KWIECIEN, S.; BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, P. C.; KONTUREK S. J. The role of reactive oxygen species in action of nitric oxide-donors on stress-induced gastric mucosal lesions. **Journal of Physiology and Pharmacology**. v.53, p.761-73, 2002 b.

LEMOS, M. **Avaliação da atividade antiúlcera do extrato bruto hidroalcoólico das folhas de *copaifera langsdorffii* desf.** Monografia para título de especialista. Videira – SC, 2009

LEWIS, D.A.; HANSON, P.J. Anti-Ulcer Drugs of Plant Origin In: G. P. Ellis; G. B. West. **Progress in Medicinal Chemistry**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, v. 28, p.201-231, 1991.

LEWIS, D.A.E; SHAW, G.P. A natural flavonoid and synthetic analogues protect the gastric mucosa from aspirin-induced erosions. **Journal Nutrition Biochemistry**, v. 12, p. 95-100, 2001.

LUSTOSA, S.R.; GALINDO A.B; NUNES, C.C.N.; RANDAU, K.P.; ROLIM, N.P.J. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia 19(1):47-55, jan./fev., 2006 **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 2008.

MAIA-ARAUJO. I.L.F. **Estudo da atividade antimicrobiana de variedades de própolis da região da Foz do Rio São Francisco – Brasil.** Dissertação de Mestrado,UNIT. ARACAJ, Aju. BRASIL. 2009.

MAYER, B. **Mecanismos envolvidos nas ações antiúlcera e anti-secretora ácida dos extratos da *Salvia officinalis* L.**, Dissertação de Mestrado,Universidade Federal do Paraná. Paraná/Curitiba. BRASIL.2007.

MORIMOTO, Y.; SHIMOHARA, K.; OSHIMA, S.; SUKAMOTO, T. **Effects of the new antiulcer agent KB-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of trepenone and cimetidine**, *Japan J. Pharmacol.*, 57, p.497- 505, 1991.

MANARA, L. R. B.; GROMATZKY, A.; CONDE, M. C.; BRETZ, W. A. Utilização da própolis em odontologia. **Revista FOB**, v. 7, n 3/4, p. 15-20, 1999.

OATES, P.C.J.; HAKKINEN, J. P. Studies on the mechanism of Ethanol-induced gastric damage in rats. **Gastroenterol.** v. 94, p. 10-21, 1988.

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ABREU, J. A. S. Estudo da Preparação dos Extratos de Própolis e suas Aplicações. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 3, Ago./Oct. 1998.

PINHEIRO, M.S. **Avaliação da atividade antimicrobiana e citoprotetora gástrica dos extratos de mangaba, caju e própolis vermelha**. Dissertação de Mestrado, UNIT. ARACAJU, SE. BRASIL. 2009.

SAUL, C; TEIXEIRA, C. R; PEREIRA-LIMA, J. C; TORRESINI, R. J. S. Prevalence reduction of duodenal ulcer: a Brazilian study. (retrospective analysis in the last decade: 1996-2005). **Arq. Gastroenterol.**, São Paulo, v. 44, n. 4, Dec. 2007.

SILVA, A. R; RODRIGUES, A. E; RIBEIRO, M. C .M; CUSTÓDIO, A. R; ANDRADE, N. E. D; PEREIRA, W. E. Características físico-químicas e atividade antimicrobiana de extratos de própolis da Paraíba, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.6, p.1842-1848, nov-dez, 2006.

SIQUIERA, A. L. **Estudo da ação antibacteriana do extrato etanólico de própolis vermelha sobre *Enterococcus faecalis***. Dissertação de Mestrado, UNIT. ARACAJU, SE. BRASIL. 2008.

SOUSA, A. P. B; PASSOS, J. P. G.; PADILHA, F. F; ALBUQUERQUE JÚNIOR, R. L. C; CARDOSO, J.C Efetividade da *Delphinium staphysagria* 6cH e 30cH em ensaios biológicos para cicatrização. **Brazilian Homeopathic Journal** v. 11, n. 1, p. 13 - 14, 2009.

SUN, S.B.; MATSUMOTO, T.; YAMADA, H..Effects of a polysaccharide fraction from the roots of *Bupleurum folcatum* L. on experimental gastric ulcer models in rats and mice. **Journal Pharmacy and Pharmacology**, v. 43, p. 699–704, 1991.

SHAY, H.; KOMAROV, S.A.; FELS, S.S.; MERANZE, D.; GRUENSTEIN, M.; SIPLET, H. A simple method for the uniform production of gastric ulceration in rat. **Gastroenterology**. V. 5, p. 43-61, 1945.

SZELENYI, I.; THIEMER, K. Distention ulcer as a model for testing of drugs for ulcerogenic side effects. **Arch. Toxicol.** p. 41, 99-105, 1979.

TWARDOWSCHY, A **Vias envolvidas no mecanismo de ação do efeito gastroprotetor das cascas de *Tabebuia avellanadae* Lorentz ex Griseb (Bignoniaceae)**. Dissertação de mestrado em Farmacologia. UFP. Paraná. Curitiba. Brasil. 2007.

TRUSHEVA B, Popova M, Bankova V, Simova S, Marcucci MC, Miorin PL, et al. Bioactive constituents of Brazilian propolis. **Evid Based Complement Alternat Med** 2006;3:249–54.

VARGAS, A.C. de; LOGUERCIO, A. P.; WITT, N. M.; COSTA, M.M. da.; SILVA, M.S. Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcoólico de própolis. **Ciência Rural**, v.34, n.1, p.159-163, 2004.

VINAGRE, A.M. **Anti-ulcerogênico do extrato de *Cholorella vulgaris***. Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção de Título de Mestre em Biologia Funcional e Molecular, na área de Fisiologia. UNICAMP – SP. 2005

WALLACE, J.L. Mechanisms of protection and healing: current knowledge and future research. **American Journal Medicine**, v. 110, n. 1A, p.19S-23S, 2001.

WOLFE, M.M.; SOLL, A.H. The physiology of gastric acid secretion. **New England Journal Medicine**, v.319, n. 26, p. 1707-15, 1988.

WOLFE, M. M.; SANCHS, G. Acid suppression: Optimizing therapy for gastrroduodenal ulcer healing, gastroesophageal reflux disease, and stress-related erosive syndrome. **Gastroenterology**, v. 118, p. 9-31, 2000.

WOLFF, L. F.; GONÇALVES, M. M.; MEDEIROS, C. A. **Apicultura como Estratégia Econômica de Alternativa ao Cultivo do Tabaco na Agricultura Familiar**. Rev. Bras. de Agroecologia/nov. Vol. 4 No. 2. 2009.

ZUANAZZI, J. A. S. Flavonóides. In: C. M. O. SIMÕES; SCHENKEL; G. GOSMANN; J. C. P. MELLO; L. A. MENTZ; P. R. PETROVICK. **Farmacognosia. Da planta ao medicamento**, 1ª edição, Florianópolis, Santa Catarina: Editora da Universidade do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, p. 489-516, 1999.

CAPÍTULO 2

Avaliação da atividade gastroprotetora do extrato de própolis vermelha em diferentes modelos biológicos

Resumo

A própolis é um produto natural produzido por abelhas a partir de substâncias coletadas da flora da cada região. Esta particularidade lhe confere uma grande variabilidade nas características físicas e bioquímicas. No Nordeste, uma destas variedades é a própolis vermelha, que por ter sido descoberta recentemente ainda requer muitos estudos na tentativa de conhecer melhor suas propriedades biológicas. Portanto, o presente trabalho avaliou a atividade gastroprotetora da própolis vermelha em modelos biológicos para indução de lesão gástrica. Para tanto, utilizou-se o etanol absoluto e anti-inflamatório não esteroide (AINEs) como agentes agressores bem como o modelo de ligadura de piloro para avaliação da hipersecreção gástrica e produção de muco. Os resultados do modelo por etanol absoluto demonstraram que o extrato hidroalcoólico de própolis vermelha (EHPV), na dose de 500 mg.Kg⁻¹ apresentou atividade gastroprotetora semelhante ao omeprazol. Já na indução por AINEs, o efeito gastroprotetor foi evidenciado apenas pelo histopatológico na mesma dose observada na metodologia por álcool, pois, macroscopicamente não foi possível observar presença de lesões. No método de ligadura de piloro, o EHPV não alterou o pH, mas apresentou modificações no volume gástrico e na concentração de íons de hidrogênio. O mesmo modelo também demonstrou que o EHPV na dose de 500 mg.Kg⁻¹ aumentou a produção de muco. Diante disto, conclui-se que o EHPV apresentou atividade gastroprotetora nos modelos testados para indução de lesão gástrica.

Palavras chave: Gastroproteção, própolis vermelha, modelos biológicos.

Abstract

The propolis is a natural resin produced by bees from regional flora substances. This particularity confers it a great variability in the physical and biochemists characteristics. One of these varieties is the red propolis, produced Brazilian Northeast, have been discovered recently and many studies must be performed in order to know its biological properties. Therefore, the present work evaluated the gastroprotector activity of the red propolis in biological models for induction of gastric injury. It was used of biological

models using ethanol absolute and not steroidal anti-inflammatory (AINEs) as aggressor agents. The model of pylorus ligation for evaluation of the gastric hypersecretion and mucus production was used. The results of the ethanol model had demonstrated that the EHPV in the dose of 500 mg.Kg⁻¹ presented similar gastroprotector activity to omeprazole. The induction using AINEs, the gastroprotector effect was evidenced for the histopathological analysis. The macroscopic analysis was not possible to observe the presence of injuries. In the method of pylorus ligation, the EHPV did not modify the pH, but the gastric volume and the concentration of hydrogen ions changed. The same model demonstrated that the EHPV, in the dose of 500 mg.Kg⁻¹, that the production of mucus was increased. It concludes that the EHPV presented gastroprotector activity in these models.

Keywords: Gastroprotection, red propolis, biological models.

1. Introdução

As lesões ulcerosas agudas ou crônicas ocorrem em decorrência do desequilíbrio entre fatores protetores e agressores. Geralmente, essas lesões aparecem em qualquer porção do trato gastrointestinal devido à exposição a substâncias agressoras endógenas, como o suco ácido-péptico, a pepsina e a bile. O tabagismo, a ingestão de etanol, cafeína e anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) são considerados agentes agressores exógenos. A diminuição de substâncias protetoras endógenas também contribui para a instalação da lesão (D'ACAMPORA et al., 2008).

Ensaio biológico pré-clínico envolvendo fatores agressores e/ou protetores têm sido utilizados para avaliar o potencial gastroprotetor e possível mecanismo de ação de diversas substâncias. Os medicamentos atualmente comercializados podem causar reações adversas, principalmente pela necessidade do seu uso crônico. Desta forma, a busca de novas substâncias gastroprotetoras, principalmente de origem natural tem sido alvo de diversos estudos (BELIZÁRIO-SOUZA, 2009).

A própolis verde, um produto apícola brasileiro muito estudado tem apresentado resultados satisfatórios para este tipo de lesão (BARROS et al., 2007). A própolis vermelha, uma variedade ainda cientificamente pouco explorada, é encontrada no litoral brasileiro, mais especificamente no nordeste do país. Alguns estudos recentes tem demonstrado seu potencial biológico, observando propriedades

antimicrobianas (BITTENCOURT, 2008; SIQUEIRA, 2008; MAIA - ARAUJO, 2009, PINHEIRO, 2009) e cicatrizantes (ALBUQUERQUE JR et al., 2009). Estudos preliminares evidenciaram excelente atividade gastroprotetora do extrato hidroalcoólico desta variedade, porém com a utilização de co-solventes que demonstraram ação sinérgica (PINHEIRO, 2009).

Portanto, o presente projeto avaliou a atividade gastroprotetora do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha ressuspenso em tensoativo inerte, utilizando diferentes modelos para avaliação gastroprotetora *in vivo*.

2. Material e Métodos

2.1. Obtenção da própolis vermelha

As amostras de própolis vermelha foram obtidas de apiário localizado no município de Brejo Grande/Sergipe/Brasil (S – 10°28'25" e W – 36°26'12"), em janeiro de 2009.

2.2. Extração hidroalcoólica de própolis vermelha (EHPV)

Para extração das substâncias ativas da própolis vermelha foram realizadas extrações utilizando etanol 70% como solvente extrator na proporção própolis/solvente 1:100 (m/v). A extração foi realizada por maceração simples durante 24 horas sob agitação constante em temperatura ambiente. Em seguida a solução foi filtrada com papel de filtro e distribuída em placas de Petri para secagem em estufa bacteriológica com a finalidade de obter o extrato seco de própolis vermelha.

2.3. Teor de flavonóides

A quercetina (Sigma) foi utilizada para obtenção da curva padrão. As flavonas e flavonóis foram expressos como equivalente de quercetina. A leitura foi feita em espectrofotômetro, utilizando-se 0,5 mL da amostra, 1,5 mL de etanol 95% (v/v), 0,1 mL de cloreto de alumínio a 10% (m/v), 0,1 mL de acetato de potássio 1 mol.L⁻¹ e 2,8 mL de água destilada. Para o branco, o cloreto de alumínio e o acetato de potássio foram substituídos por água destilada. Após repouso da solução por 40 minutos em temperatura ambiente, foi feita a leitura em espectrofotômetro a 415 nm (ADELMANN, 2005).

2.4. Avaliação da ação gastroprotetora dos extratos de própolis vermelha.

2.4.1. Animais

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Tiradentes sob o parecer consubstanciado 250608. Para os ensaios de ligadura de piloro e etanol absoluto foram utilizados ratos machos *Novergicus albinus* da linhagem Wistar, pesando 300 ± 50 g e camundongos Swiss machos, com pesos de 35 – 45g para o modelo que utiliza antiinflamatório não esteroideal. Todos os animais foram mantidos em condições padronizadas, com ciclo claro-escuro de 12 h, tratados com ração do tipo padrão (Labina) e água *ad libitum*.

2.4.2. Ligadura de piloro

Os animais (6 em cada grupo) foram submetidos a jejum de 36 horas, com livre acesso à água, segundo metodologia descrita por VINAGRE (2005). Após este período, foi realizada uma incisão longitudinal logo abaixo da apófise xifóide para localização e ligadura do piloro. Posteriormente, foi feita administração intraduodenalmente utilizando a água (10 mL/Kg), como controle negativo, a cimetidina como positivo (100 mg.Kg^{-1}), controle solvente Tween 80 (10 mL.Kg^{-1}) e o EHPV nas doses 50, 250 e 500 mg.Kg^{-1} . Quatro horas após a cirurgia, os animais foram sacrificados e a incisão foi reaberta, mantendo-se a ligadura do piloro (para preservação do conteúdo gástrico) e retirado os estômagos para contagem e classificação das lesões ulcerativas. Os espécimes foram removidos e o conteúdo gástrico coletado foi centrifugado a $8000 \times g$, 25°C , 10 min para determinação da acidez gástrica e do pH. A secreção ácida total foi determinada por titulação do sobrenadante com pH 7,0 usando solução padrão de NaOH a 0.01 mol.L^{-1} e fenoftaleína como indicador. Os controles negativos e positivos foram respectivamente salina e carbenoxolona.

2.4.3. Indução de lesão gástrica usando AINEs como agente agressor.

Os grupos com 6 animais; separados aleatoriamente e os mesmos submetidos a jejum de 24 horas, com livre acesso a água. Após 30 minutos da administração por via oral dos tratamentos, cada animal recebeu por via subcutânea de 60 mg.kg^{-1} de uma suspensão aquosa de indometacina, de acordo com a metodologia descrita por MORIMOTO et al. (1991). Seis horas após a administração da indometacina, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e seus estômagos retirados, abertos ao longo da maior curvatura e lavados em solução salina.

2.4.4. Indução de lesão gástrica utilizando etanol absoluto como agente agressor.

Vinte e quatro animais distribuídos em grupos de seis foram submetidos a jejum de 24 horas com livre acesso à água. Após este período cada grupo recebeu o tratamento com EHPV nas doses 50, 250 e 500 mg.Kg⁻¹ (via oral). O tween 80 (10mL.Kg⁻¹) foi utilizado como controle negativo e o omeprazol (100 mg.Kg⁻¹) como controle positivo.

Os animais após 30 minutos da administração dos respectivos tratamentos receberam por via oral 1,0 mL de etanol absoluto. Após 1 hora da administração do etanol, os animais foram sacrificados e seus estômagos retirados, lavados com solução salina e abertos na sua maior curvatura para contagem das lesões ulcerativas e cálculos do índice de lesões ulcerativas (ILU), (ROBERT et al, 1979).

2.4.5. Cálculo de índice de lesões gástricas

Neste método foram utilizadas imagens digitalizadas dos estômagos e analisadas pelo software “EARP” com o objetivo de mensurar os pontos de lesão gástrica. Após marcação das lesões, o programa calculou a área de cada lesão. As lesões foram classificadas através dos níveis I <1mm²; II 1 – 3 mm²; e III > 3mm². A determinação do índice de lesão ulcerativa realizou-se pela fórmula: 1 x (número de lesões nível I) + 2 x (número de lesões nível II) + 3 x (número de lesões nível III). O % C= 100 – (IU tratado x 100/ IU controle) (BARROS et al., 2007).

2.4.6. Análises histológicas

Os espécimes retirados dos ensaios com etanol absoluto e AINE, para foram fixados em formalina tamponada neutra a 10% por um período de 24 horas. As amostras foram desidratadas com etanol, clareada com xileno e infiltrada com parafina. A última etapa foi conduzida por inclusão na parafina. Cortes de aproximadamente 5 µm de espessura foram realizados e os espécimes processados de acordo com o protocolo da técnica histoquímica da hematoxilina/eosina. Os padrões de alteração da mucosa gástrica, verificando presença de hemorragias, exsudatos, edemas e áreas de necrose foram observados.

2.4.7. Análise Estatística

Os dados foram tratados pelo programa Statistica 7.0 através do método de análise de variância (ANOVA), seguido de Dunnet's com valores de $p < 0.05$ considerados significantes.

3. Resultados e Discussão

3.1. Teor de flavonóides

O EHPV utilizado no presente estudo apresentou 1,7% de flavonóides em equivalentes de quercetina. Este resultado foi semelhante aos estudos realizados com a própolis verde da região sul e sudeste do país, que apresentaram em extratos hidroalcolóicos teores que variaram entre 1 a 2,8% (SOUSA et al., 2007; BURIOL et al., 2009). Amostras de EHPV da região de Brejo Grande/SE em outros trabalhos apresentaram diferentes concentrações de flavonóides, variando entre 0,5% (PINHEIRO, 2009; MAIA-ARAÚJO, 2009) até 1,8% (BITTENCOURT, 2008). O limite estabelecido pelo Ministério da Agricultura e do Abastecimento para extrato de própolis é de no mínimo 0,25% de flavonóides (m/m) (BRASIL, 2001).

Segundo Lustosa et al. (2008), a própolis é uma mistura complexa, formada por material resinoso e balsâmico. Sua composição química é complexa e variada, estando relacionada com a flora de cada região visitada pelas abelhas e com o período de coleta da resina. A própolis vermelha é uma das variedades deste produto apícola e tem sido produzida na região nordeste do país, especialmente no litoral sergipano e alagoano (DAUGSCH, 2007). Park et al. (1998) classificaram as diferentes variedades de própolis levando em consideração a coloração das mesmas. A própolis vermelha brasileira foi classificada como tipo 13 por DAUGSCH (2007). Este autor também identificou a origem botânica desta variedade indicando a *Dalbergia ecastophyllum* como principal fonte botânica para produção da própolis vermelha. Porém, o pasto apícola da região onde a amostra foi coletada para o presente trabalho não apresenta a referida espécie, o que indica que esta amostra pode ter outra origem botânica e conseqüente diferenciação na composição química e atividade biológica. (MAIA-ARAÚJO, 2009).

A alteração da coloração sugere uma modificação na composição química do produto. Os produtos naturais possuem esta característica que vem sendo contornada pela padronização das amostras, quantificando substâncias marcadoras como flavonóides presentes nas amostras de própolis verde (NUNES et al., 2009). Os

marcadores químicos servem como padrão para comparar resultados obtidos de diferentes amostras. As doses utilizadas geralmente são expressas em concentração de extrato, porém a determinação do teor dos marcadores no extrato é extremamente importante, já que estes compostos estão relacionados à atividade biológica (SOUSA et al., 2007).

A atividade biológica pode variar com a composição química, porém segundo Maia-Araújo (2009), nem sempre a coloração está diretamente relacionada com a ação do produto. Variedades com coloração distintas podem resultar em atividades biológicas semelhantes e variedades com coloração similar podem apresentar resultados distintos.

Apesar da coloração e rendimento serem aspectos importantes para produção e comercialização do produto, o doseamento de marcadores torna-se imprescindível para os ensaios biológicos, uma vez que a resposta farmacológica e a toxicidade é geralmente dose dependente (NUNES et al., 2009).

Os flavonóides são moléculas que possuem inúmeras atividades biológicas e são utilizados como marcadores químicos de diversos produtos naturais. Dentre os flavonóides descritos com ação biológica destacam-se a quercetina, além da galangina, pinocembrina e kaempferol, que apresentam atividade gastroprotetora e previnem lesões da mucosa gástrica produzidas por vários métodos de indução de lesão, através de mecanismo antiinflamatório da atividade inibitória contra a ciclooxigenase (COX) e lipoxigenase (LEWIS, 1991; HARBONE e WILLIAMS, 2000; BURIOL, et al 2009).

De acordo com Maia-Araújo (2009), os flavonóides apresentam atividade seqüestradora de espécies reativas de oxigênio (EROs). Estas são geradas pelo metabolismo do ácido araquidônico, plaquetas, macrófagos e células musculares lisas e podem contribuir de forma significativa para o dano na mucosa gástrica (REPETTO & LLESUY, 2002; KOSALEC, et al 2005).

3.2. Modelo de Ligadura de piloro - Avaliação da secreção ácida e de produção de muco.

Em doses menores de EHPV (50 mg.kg⁻¹) foi observado um aumento da concentração de íons H⁺ em relação ao grupo controle (água) (p=0,0014), o que indica uma possível atividade da EHPV como agente secretor de ácido (tabela 1). Nesta dose (50 mg.kg⁻¹), o EHPV pode não ter sido capaz de inibir a produção de prostaglandinas (PGs), que em concentrações mais altas são capazes de se ligar a receptores de prostaglandinas tipo 4 (EP4), presentes em células parietais e

principais, estimulando a secreção gástrica (TWARDOWSCHY, 2007). Desta forma, as PGs, agem modulando positivamente, aumentando a secreção de ácido.

À medida que a dose de EHPV foi aumentada, observou-se uma tendência à diminuição gradativa nos níveis de H^+ , porém sem diferença significativa em relação ao controle negativo ($p=0,1807$ e $p=0,1403$ para 250 e 500 $mg.kg^{-1}$, respectivamente). Estes resultados sugerem uma tendência do EHPV em contribuir para a modulação negativa da secreção ácida, pois as PGs em baixas concentrações inibem a secreção pela ligação a receptores EP3 presentes nas células gástricas (TWARDOWSCHY, 2007). Segundo Barros et al. (2007), extratos de própolis são inibidores de PGs, e que em doses baixas, os mesmos não são capazes de inibir a secreção de H^+ , já em doses mais elevadas (250 e 500 $mg.kg^{-1}$) apresentam resultados significativos.

Tabela 1. Parâmetros bioquímicos do suco gástrico de ratos submetidos a ligadura do piloro, tratados por via intraduodenal.

Tratamentos	Dose ($mg.Kg^{-1}$)	pH	Volume gástrico (mL)	$[H^+]$ (mEq.g ⁻¹ /L)
Salina	3	3,4±0,5	1,2±0,1	46,8±6,4
EHPV	50	3,4±0,3	0,7±0,2*	65,9±6,6*
	250	3,4±0,3	0,8±0,2*	56,0±8,2
	500	3,3±0,0	1,0±0,2	36,3±8,7
Cimetidina	100	6,1±1,1*	0,8±0,1*	27,5±7,7*

* $p < 0.05$ quando comparado ao grupo controle utilizando ANOVA seguido de Dunnet.

Na avaliação do pH, observou-se que os grupos tratados com EHPV não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle ($p>1,0$ para todos os tratamentos), demonstrando que o EHPV não alterou o pH. A cimetidina apresentou significativo aumento de pH ($p=0,000007$) como pode ser observado na tabela 1. Apesar de em maiores doses de EHPV a concentração de H^+ no conteúdo gástrico diminuir, esta alteração não foi capaz de modificar o pH, provavelmente por não ser suficiente para desequilibrar o sistema tampão existente no suco gástrico.

O EHPV em doses mais baixas apresentou uma diminuição do volume gástrico, agindo de maneira semelhante ao controle positivo (cimetidina) ($p= 0,0037$, $p= 0,0275$ e $p= 0,0127$ para 50, 250 $mg.Kg^{-1}$ e cimetidina, respectivamente). Na dosagem de 500 $mg.Kg^{-1}$ não foi observado diferença significativa quando comparado

ao controle negativo ($p=0,1585$) (tabela 1). Apesar da concentração de H^+ apresentar-se reduzida pela provável diminuição de secreção de ácido clorídrico, esta não interferiu de maneira direta o volume gástrico. Este comportamento também foi evidenciado por Twardowschy (2007), onde o mesmo demonstrou que a diminuição da secreção ácida não foi acompanhada pela diminuição do volume gástrico.

O aumento de volume gástrico decorre da intervenção cirúrgica, que além de obstruir a passagem de conteúdo ainda estimula a produção de secreção, devido a uma resposta vagal que age nas fibras aferentes transmitindo informações sensoriais do estômago até o tronco cerebral e fibras eferentes que formam o tronco motor dos reflexos vago-vagais (TEBBE et al., 2003). A distensão da mucosa causada pela obstrução do piloro aumenta a liberação de acetilcolina pelo vago, que atua diretamente sobre as células parietais, sobre as células G, liberando histamina e gastrina respectivamente, induzindo por sua vez a formação de lesões ulcerativas pelo estímulo da secreção do ácido clorídrico que se acumula no lúmen do estômago (SHAY et al., 1945; BAGGIO et al., 2003). A acetilcolina e gastrina se ligam a receptores específicos presentes nas células eletrocromafins (ECL), as quais são responsáveis pela produção de histamina, resultando na hipersecreção gástrica pelas células parietais (VINAGRE, 2005; MAYER, 2007). Outro mecanismo envolvido na produção de ácido é modulado pela presença de prostaglandinas. Estes estimulam a histamina e, portanto também participam da produção gástrica.

No controle positivo foi usado a cimetidina, que é um antagonista de receptores H_2 comumente utilizado na terapêutica de lesões gástricas e age como inibidor competitivo da histamina com seu receptor, sendo altamente seletiva não interagindo com receptores H_1 . Além disso, pode aumentar a síntese das PGs (PACHECO et al., 2006).

Alguns trabalhos utilizando extratos de própolis foram publicados demonstrando seu potencial antiinflamatório e relacionando esta ação com os flavonóides. Estes autores relatam que os componentes presentes no extrato hidroalcolico de própolis podem inibir a atividade das cicloxigenases (COX) e lipoxigenases que são enzimas relacionadas com a resposta inflamatória. Alguns compostos presentes nos extratos, como o ácido fenil éster cafeico (CAPE) que, inibe a liberação de ácido araquidônico pode inibir a atividade da COX. Também tem sido demonstrado que a própolis inibe a síntese de PG e ativam o timo, gerando um aumento da atividade do sistema imune, aumentando a atividade fagocítica (KOSALEC et al., 2005; LUSTOSA et al., 2008). Estas células de defesa liberadoras de histamina, como mastócitos e macrófagos, estão presentes na lâmina própria, e

quando ativadas liberam grande quantidade de PGs. Desta forma ocorre a alteração do fluxo sanguíneo da mucosa e aumento de granulócitos para a região afetada, promovendo uma diminuição da perfusão sanguínea da mucosa gástrica, resultando em formação de erosões e úlcera (WALLACE & GRANGER, 1996).

A tabela 2 apresenta os resultados da avaliação da produção de muco. Foi utilizado a salina e a carbenoxolona como controles negativo e positivo respectivamente, e observou-se que os grupos tratados com o EHPV nas doses de 50 e 250 mg.Kg⁻¹ (p=0,443 e p=0,141, respectivamente) não apresentaram diferença significativa em relação ao controle negativo. Este mesmo comportamento não foi observado quando se utilizou a dose de 500 mg.Kg⁻¹ (p=0,048). Este aumento do muco observado nos tratamentos com doses mais baixas do EHPV parece ter influenciado no aumento do volume de secreção conforme demonstrado na tabela 1.

Tabela 2. Efeitos da administração intraduodenal das amostras nos parâmetros bioquímicos de ratos submetidos à ligadura de piloro para determinação do muco.

Tratamentos	Dose (mg.Kg ⁻¹)	Quantidade de Alcian Blue ligado (mg/g tecido)
Controle	100	1,15±0,07
EHPV	50	1,21±0,04
	250	1,25±0,05
	500	1,28±0,06*
Carbenoxolona	200	1,16±0,09

* $p < 0.05$ quando comparado ao grupo controle utilizando ANOVA seguido de Dunnet

O aumento da quantidade de muco na mucosa gástrica envolvido na gastroproteção pode estar relacionado com o aumento da concentração de fosfolipídios, os quais contribuem para formação de um filme protetor. A camada de fosfolipídeos apresenta uma característica surfactante, que forma uma superfície hidrofóbica natural, proporcionando uma maior proteção contra os agentes lesivos da secreção ácida (LEMOS, 2009).

Segundo Cristoni et al. (1989) e Gracioso et al. (2002), a ação gastroprotetora dos flavonóides naturais, presentes nos EHPV de forma geral, ocorre através da estimulação da secreção de muco e bicarbonato ou por um efeito inibitório direto na bomba de prótons das células parietais (BEIL et al., 1995). De acordo com Wallace (2001), estas secreções são reguladas pela síntese de prostaglandinas e, portanto,

quando um há uma redução desta, aumenta, portanto, a susceptibilidade da mucosa à lesão.

Os medicamentos como a carbenoxolona atuam aumentando a secreção de muco, porém nos resultados obtidos foi observado que este grupo não apresentou aumento significativo em relação ao grupo controle negativo ($p=0,915$) (tabela 2). Já os grupos tratados com diferentes doses de EHPV apresentaram aumento significativo no volume de muco, o que pode justificar o aumento de volume gástrico observado nos resultados apresentados na tabela 1.

Desta forma, os resultados da avaliação do EHPV na atividade gastroprotetora por meio de ligadura de piloro demonstram um comportamento que indica uma atividade anti-secretória de ácido ao mesmo tempo em que promove um aumento de muco na mucosa gástrica. Este fenômeno parece ter ligação com a modulação das PGs e da regulação da atividade histamínica mediada por células de defesa como os mastócitos.

3.3 - Induções de úlcera gástrica em ratos por etanol absoluto.

Através deste método de indução, observou-se que os grupos omeprazol e EHPV na dose de 500 mg.Kg^{-1} apresentaram uma significativa ação protetora na mucosa gástrica quando comparada ao controle negativo ($p=0,000420$ e $p=0,000112$, respectivamente).

Tabela 3. Efeito gastroprotetor do EHPV em modelo de indução de lesão gástrica por etanol em modelo animal de acordo com o EARP.

Grupos dose (mg/Kg)	Área da lesão (%)	ILU	Inibição da LU (%)
Tween 80	$7,16 \pm 3,00^a$	16 ± 2^a	-
EHPV50	$5,25 \pm 2,82^a$	14 ± 9^a	10,42
EHPV250	$5,24 \pm 1,95^a$	18 ± 3^a	-14,58
EHPV500	$1,30 \pm 1,54^b$	5 ± 6^a	70,83
Omeprazol 100	$0,33 \pm 0,57^b$	2 ± 3^b	88,75

Letras iguais na mesma coluna significam resultados semelhantes para $p > 0,05$.

De acordo com Barros *et al.* (2007), e Lustosa *et al.* (2008), o etanol reduz a produção de muco, bicarbonato, os níveis endógenos de prostaglandinas, glutathione. Além disso, ativam os mecanismos que são considerados fatores agressores, como o aumento da liberação de histamina, de íons cálcio, produção de radicais livres e de leucotrienos. Com o desequilíbrio entre os fatores defensores e agressores, instala-se a lesão na mucosa. A atividade gastroprotetora do EHPV na dose de 500 mg.kg⁻¹ (equivalente a 8,5 mg de quercetina) pode estar relacionada com a presença de flavonóides, que através de sua capacidade sequestradora de radicais livres, diminui o estresse causado pelo agente agressor na mucosa gástrica.

A figura 1 apresenta fotomicrografias das secções histológicas coradas com hematoxilina – eosina dos estômagos de ratos submetidos ao modelo de indução de lesão gástrica por etanol absoluto.

Diante deste estudo histomorfológico, no grupo tratado com omeprazol foi possível evidenciar extensa área de preservação do epitélio foveolar. As glândulas fúndicas mostraram-se bem definidas e as células parietais e principais apresentaram-se compatíveis com a normalidade. Contudo foi possível observar poucas áreas focais de hiperemia e presença ocasionais de linfócitos da lâmina própria. Este fármaco é muito utilizado como gastroprotetor, pois atua inibindo a bomba de prótons, e conseqüentemente a secreção de ácido clorídrico (GUIMARÃES *et al.*, 2006).

No grupo controle solvente (Tween 80), observou-se alterações epiteliais de extensão variável representadas por modificações eosinofílicas de aspecto fibrinóide com perda da organização arquitetural glandular superficial, desaparecimento (apagamento) de células parietais e manutenção do arcabouço morfológico das células principais, associada à perda do núcleo e aumento da eosinofilia citoplasmática (lembrando necrose). Observa-se ainda infiltração de células redondas compatíveis com linfócitos de intensidade variando de leve à moderada. Apesar das alterações se concentrarem na porção esofágica, há comprometimento da porção pilórica.

O grupo tratado com a dose de 50 mg.Kg⁻¹ do EPVH (figura 1) apresentou alterações semelhantes ao grupo tween, na porção esofágica do estômago, embora estas sejam limitadas a áreas focadas de pequena extensão do tecido epitelial glandular. A região pilórica não demonstrou comprometimento histológico.

Os grupos que receberam as doses de 250 e 500 mg.Kg⁻¹ apresentaram epitélio glandular preservado em sua maior extensão. Quando presentes as lesões se limitavam mais ao terço superficial do epitélio e a região esofágica. Embora no grupo 500, em 50% dos casos nem mesmo a região esofágica apresentou comprometimento.

O consumo excessivo de álcool tem um importante papel na etiologia da úlcera péptica em humanos (STERMER, 2002). Embora estas lesões produzidas pelo agente necrosante em roedores não representam integralmente as características da úlcera que se desenvolve em humanos (pois essas lesões nos roedores são superficiais e agudas), esse modelo tem validade preditiva para a pesquisa de novas drogas potencialmente efetivas para o uso clínico.

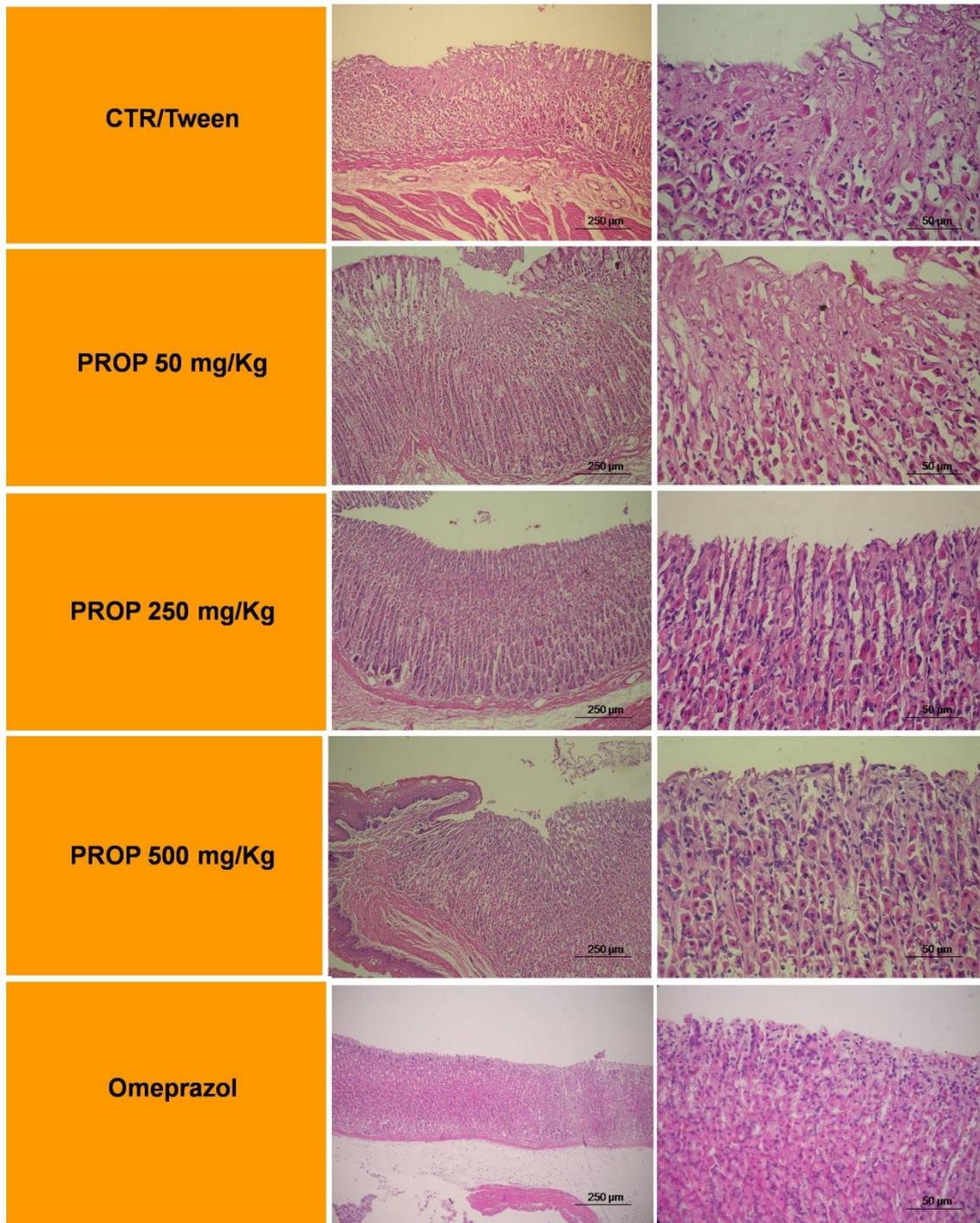


Figura 1. Fotomicrografias das secções histológicas coradas em HE dos estômagos de ratos submetidos ao protocolo de lesão gástrica por etanol absoluto.

3.4 - Indução de lesão gástrica em ratos por Indometacina.

De acordo com Wallace (2001), os fármacos anti-inflamatórios como a indometacina, causam lesões no trato gastrointestinal através dos efeitos condicionados à supressão da síntese de (PGs). Como estas participam efetivamente do mecanismo protetor, sua diminuição pode aumentar a susceptibilidade da mucosa à lesão. Além disso, os AINES também são responsáveis pela diminuição de secreção do bicarbonato (BRZOZOWKI *et al.*, 2005). Barros *et al.* (2007), utilizando extrato de própolis verde, também demonstraram resultados positivos para atividade gastroprotetora com o mesmo método de indução de lesão gástrica.

Não foi possível evidenciar lesões no exame macroscópico dos estômagos de camundongos, devido às espécimes serem muito pequenas e as lesões por indometacina não serem evidentes como as provocadas pelo etanol. Neste caso, o ILU não pode ser calculado, sendo a avaliação histológica a ferramenta utilizada para avaliar o dano/proteção nos tratamentos estudados.

A figura 2 mostra fotomicrografias de cortes histológicos dos estômagos de ratos no modelo de indução de lesão gástrica por indometacina no qual foi observado que os controles negativos (água e tween 80) apresentaram o mesmo padrão de alterações morfológicas, ou seja, inflamação focal na submucosa e desorganização das células na superfície do epitélio. O grupo EHPV 250 mg.Kg⁻¹ apresentou também inflamação focal na submucosa com preservação do epitélio gástrico. Já o grupo tratado com cimetidina, não foi observado lesões epiteliais e de submucosa.

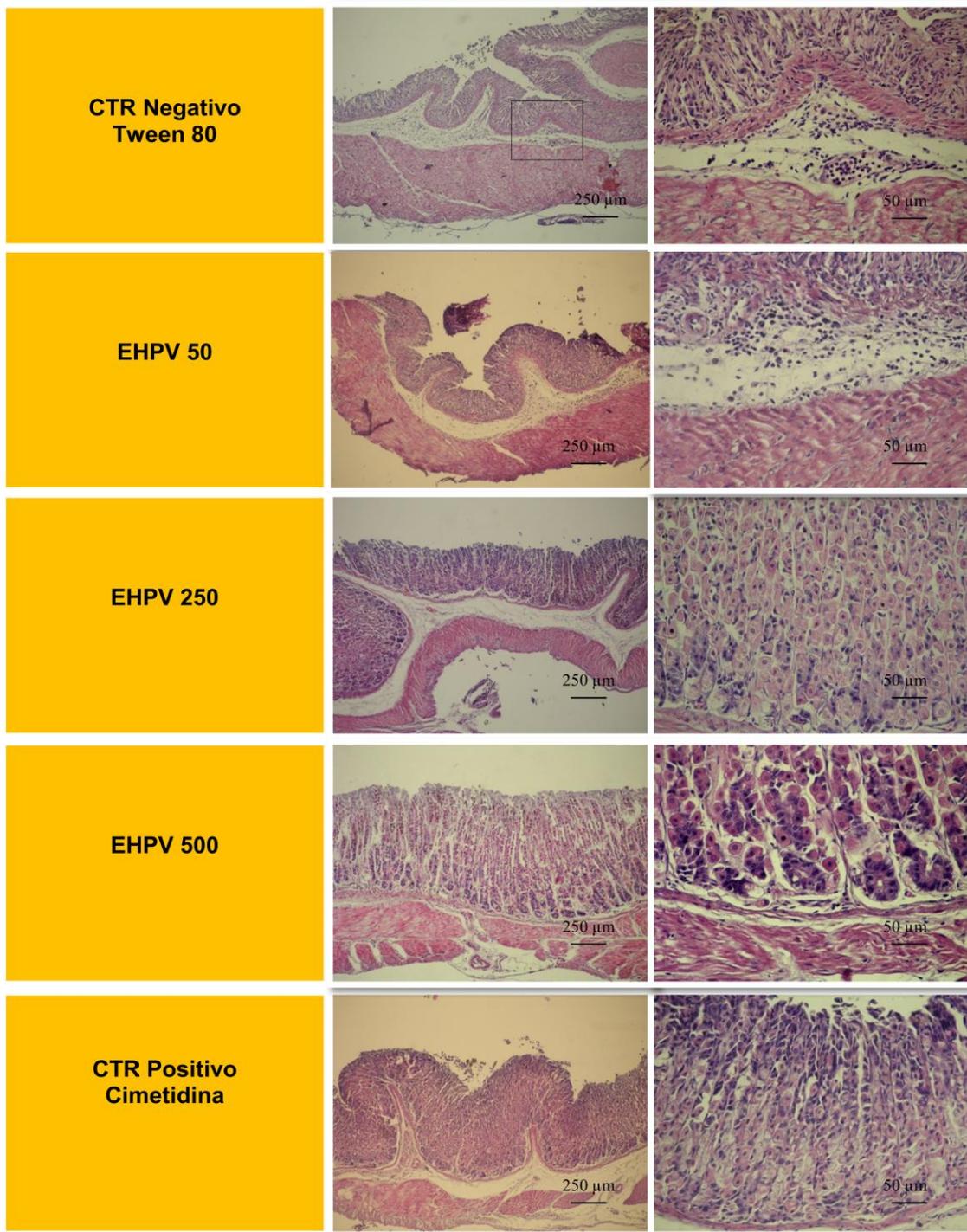


Figura 2. Fotomicrografias das secções histológicas coradas em HE dos estômagos de ratos submetidos ao protocolo de lesão gástrica por indometacina.

4. Conclusão

De acordo com a pesquisa conclui-se que o EHPV apresentou atividade gastroprotetora em todos os modelos biológicos testados e junto com diversos trabalhos mencionados, confirma-se a condição, de ser um produto natural com enorme potencial de utilização em várias enfermidades, em especial o uso no tratamento de lesões gástricas.

Referências

ADELMANN, J. **Própolis: Variabilidade Composicional, correlação com a flora e bioatividade antimicrobiana/antioxidante**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2005.

ALBUQUERQUE JÚNIOR, R.L.C.; BARRETO, A.L.S.; PIRES, J.A.; REIS, F.P.; LIMA, S.O.; RIBEIRO, M.A.G.; CARDOSO, J.C. Effect of bovine type-I collagen-based films containing red propolis on dermal wound healing in rodent model. **International Journal of Morphology**, v.27, p.1105-1110, 2009.

BAGGIO, C.H. et al. Gastroprotective effects of a crude extract of *Baccharis illinita*DC in rats. **Pharmacological Research**, v. 47, pg. 93-98, 2003.

BARRETO, A.L.S. **Estudo histomorfológico do efeito de membranas de colágeno contendo própolis vermelha sobre o processo de reparo cicatricial por segunda intenção**. Dissertação de Mestrado, UNIT. ARACAJU/SE. BRASIL, 2008.

BARROS, M.P; SOUSA, J.P.B.S; BASTOS, J.K; ANDRADE, S.F. Effect of Brazilian green propolis on experimental gastric ulcers in rats. **Journal of Ethnopharmacology** 110, 567–571, 2007.

BEIL, W.; BIRKHOLZ, C.; SEWING, K-FR. Effects of flavonoids on parietal cell acid secretion, gastric mucosal prostaglandin production and *Helicobacter pylori* growth. **Drug Research**, v. 45, n.1, p. 697-700, 1995.

BELIZÁRIO-SOUZA, A.P. **Avaliação da efetividade de medicamentos homeopáticos em ensaios biológicos de gastroproteção e cicatrização por segunda intenção**, Dissertação de Mestrado, UNIT. ARACAJU, SE. BRASIL 2009.

BITTENCOURT, F. O. **Desenvolvimento e avaliação da atividade antimicrobiana contra *Candida albicans* de formulações semi-sólidas contendo própolis vermelha**. Dissertação de Mestrado, UNIT. ARACAJU, SE. BRASIL.2008.

BRASIL, Ministério da Agricultura e do Abastecimento para extrato de própolis Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Ministério da Saúde, 2001.

BURIOL L; FINGER, D; SCHMIDT, E.M.; SANTOS J.M.T.S; ROSA, M.R; QUINÁIA, S.P; TORRES, Y.R. **Composição química e atividade biológica de extrato oleoso de própolis: uma alternativa ao extrato etanólico.** Quim. Nova, vol. 32, No. 2, 296-302, 2009.

CRISTONI, A.; MALANDRINO, S.; MAGISTRETTI, M.J. Effect of a natural flavonoid on gastric mucosal barrier. **Drug Reserach**, v. 39, n. 1, p. 590-592, 1989.

D'ACAMPORA JÁ., LIMA D.A.N., SOUSA, M.V., AQUINO A.C., RUSSI R.F. VIEIRA, J., LOPES, A. Perfil epidemiológico dos pacientes portadores de úlcera péptica perforada atendidos no centro cirúrgico do Hospital Florianópolis. **Rev. Med Res** 2008; 10(4):141-146.

DAUGSCH. A. **A própolis vermelha do Nordeste do Brasil e suas características químicas e biológicas.** Dissertação de Mestrado. UNICAMP. Campinas/SP, 2007.

DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A. A.; CAPASSO, F. Review article: Flavonoids Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Science**, v. 65, n. 4, p. 337- 353, 1999.

GUIMARÃES, E. V.; MARGUET, C.; CAMARGOS, P. A. M. Tratamento da doença do refluxo gastroesofágico, *Jornal de Pediatria*, 82(5), p. s133-s145 2006.

GRACIOSO, J. S.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C. A.; SOUSA BRITO, A. R. M. Effects of tea from *Turnera ulmifolia* L. on mouse gastric mucosa support the Turneraceae as a new source of antiulcerogenic drugs. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**. v. 25, n. 4, p. 487-491, 2002.

HARBONE, J. F.; WILLIAMS, C. A. Review: Advances in flavonoid research since. **Phytochemistry**, v. 55, p. 481-504, 2000.

KOSALEC I, PEPELJNJAK S, BAKMAZ M, VLADIMIR-KNEZEVIC S. Flavonoid analysis and antimicrobial activity of commercially available propolis product. **Acta Pharm** 55: 423-430. 2005.

LEMOS, M. **Avaliação da atividade antiúlcera do extrato bruto hidroalcoólico das folhas de *copaifera langsdorffii* desf.** Monografia para título de especialista. Videira – SC, 2009

LEWIS, D.A.; HANSON, P.J. Anti-Ulcer Drugs of Plant Origin In: G. P. Ellis; G. B. West. **Progress in Medicinal Chemistry**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, v. 28, p.201-231, 1991.

LUSTOSA, S.R.; GALINDO A.B; NUNES, C.C.N.; RANDAU, K.P.; ROLIM, N.P.J. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia 19(1):47-55, jan./fev., 2006 **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 2008.

MAIA-ARAUJO. I.L.F. **Estudo da atividade antimicrobiana de variedades de própolis da região da Foz do Rio São Francisco – Brasil.** Dissertação de Mestrado, UNIT. Aracaju, Brasil. 2009.

MAYER, B. **Mecanismos envolvidos nas ações antiúlcera e anti-secretora ácida dos extratos da *Salvia officinalis* L.**, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná. Paraná/Curitiba. Brasil.2007.

MORIMOTO, Y.; SHIMOHARA, K.; OSHIMA, S.; SUKAMOTO, T. Effects of the new antiulcer agent KB-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of trepenone and cimetidine, **Japan J. Pharmacol.**, 57, p.497- 505, 1991.

Nunes ,C. C., Galindo, A. B. Oliveira de Deus, A. S., Rufino, D. A., Randau, K. P., Xavier, H. S., Citó A. M. G. L., Neto, J. R. Variabilidade sazonal dos constituintes da própolis vermelha e bioatividade em *Artemia salina*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy** 19(2B): 524-529, Abr./Jun. 2009

PACHECO, M.T.B., BIGHETTI, E., ANTÔNIO, CARVALHO, J.E ROSANEL, C.F., SGARBIERI V.C. Effects of a whey protein concentrate and it's peptides in the protection of ulcerative lesions at rat gastric mucosa. **Rev. Nutr., Campinas**, 19(1):47-55, jan./fev., 2006

PINHEIRO, M.S. **Avaliação da atividade antimicrobiana e citoprotetora gástrica dos extratos de mangaba, caju e própolis vermelha.** Dissertação de Mestrado, UNIT. ARACAJU, SE. BRASIL. 2009.

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ABREU, J. A. S.; ALCICI, N. M. F. Estudo da Preparação dos Extratos de Própolis e suas Aplicações. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 3, Ago./Oct. 1998.

REPETTO, M. G. & LLESUY, S. F. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v.35, p.523-534, 2002.

ROBERT, A.; NEZAMIS, J. E.; LANCASTER, C.; HANCHAR, A. J. Cytoprotection by prostaglandins in Rats. **Gastroenterology**, 77:433-443, 1979.

SIQUIERA, A. L. **Estudo da ação antibacteriana do extrato etanólico de própolis vermelha sobre *Enterococcus faecalis*.** Dissertação de Mestrado, UNIT. ARACAJU, SE. BRASIL.2008.

SOUSA, J. P.B., FURTADO, N.A.J.C., SOARES A. E.E., BASTOS, J. K. Perfis físico-químico e cromatográfico de amostras de própolis produzidas nas microrregiões de Franca (SP) e Passos (MG), Brasil **Brazilian Journal of Pharmacognosy** 17(1): 85-93, Jan./Mar. 2007

SHAY, H.; KOMAROV, S.A.; FELS, S.S.; MERANZE, D.; GRUENSTEIN, M.; SIPLET, H. A simple method for the uniform production of gastric ulceration in rat. **Gastroenterology**. V. 5, p. 43-61, 1945.

STERMER, E. Alcohol consumption and the gastrointestinal tract. **The Israel Medical Association Journal**. v. 4, n. 3, p. 200-2, 2002.

TEBBE, J. J.; MRONGA, S.; SCHÄFER, M. K. H.; RUTER, J.; KOBELT, P.; MONNIKES, H. Stimulation of neurons in rat ARC inhibits gastric acid secretion via 67 hypothalamic CRF1/2- and NPY-Y1 receptors. **American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology**, v.285, p.1075-1083, 2003.

TWARDOWSCHY, A **Vias envolvidas no mecanismo de ação do efeito gastroprotetor das cascas de *Tabebuia avellanedae* Lorentz ex Griseb (Bignoniaceae)**. Dissertação de mestrado em Farmacologia. UFP. Paraná. Curitiba. Brasil. 2007

VINAGRE, A.M. **Anti-ulcerogênico do extrato de *Chlorella vulgaris***. Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção de Título de Mestre em Biologia Funcional e Molecular, na área de Fisiologia. UNICAMP – SP. 2005

WALLACE, J.L.; GRANGER, D.N. The cellular and molecular basis for gastroduodenal mucosal defense. **FASEB Journal**. V. 10, pg. 731-740, 1996.

WALLACE, J.L. Mechanisms of protection and healing: current knowledge and future research. **American Journal Medicine**, v. 110, n. 1A, p.19S-23S, 2001.

ZUANAZZI, J. A. S. C. M. O. SIMÕES; SCHENKEL; G. GOSMANN; J. C. P. MELLO; L. A. MENTZ; P. R. PETROVICK. **Farmacognosia. Da planta ao medicamento**, 1ª edição, Florianópolis, Santa Catarina: Editora da Universidade do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, p. 489-516, 1999.

CAPÍTULO 3

O modelo de ensaio biológico de gastroproteção por lesão por etanol: estudos de variáveis independentes.

RESUMO

A determinação do índice de lesões ulcerativas (ILU) tem sido realizada utilizando diferentes métodos. Estas variações metodológicas podem influenciar diretamente nos resultados e conclusões do trabalho. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo estudar a influência de algumas variáveis nos ensaios biológicos de gastroproteção utilizando como modelo de indução de lesões gástricas em ratos o etanol absoluto. Para tanto, foram utilizados ratos Wistar, os quais após 30 minutos da administração dos respectivos tratamentos receberam por via oral etanol absoluto. Após 1 hora da administração do etanol, os animais foram sacrificados e seus estômagos retirados e abertos na sua maior curvatura para contagem das lesões e cálculos do ILU. Os espécimes foram colocados em formol e submetidos à processamento histológico padrão. As variáveis estudadas foram: substância utilizada como controle positivo (omeprazol, cimetidina), substância utilizada como controle negativo (propilenoglicol, água, salina, Tween 80), substância solvente (tween 80 e propilenoglicol) e tipo de metodologia para cálculo do ILU (segundo Gamberini (1991) -GB, Szelenyi e Thiemer (1979) - ST e utilizando software EARP). Dentre as substâncias utilizadas como controle negativo, o propilenoglicol apresentou ILU menor que o grupo água ($p=0,02$). As demais substâncias apresentaram resultados semelhantes entre si ($p>0,05$). Estes resultados indicam que o propilenoglicol apresenta potencial atividade gastroprotetora, a qual foi confirmada quando o mesmo foi utilizado como solvente para a própolis vermelha. Entre os controles positivos, observou-se que a cimetidina e o omeprazol apresentaram comportamentos distintos ($p=0,006010$), sendo o omeprazol a substância mais efetiva como gastroprotetora. Na análise dos métodos para cálculo de ILU observou-se que o método EARP apresentou resultados diferentes de ST, porém similares a GB. A avaliação microscópica dos espécimes trouxe informações sobre a intensidade e extensão da lesão. Os resultados indicam que algumas variáveis interferiram significativamente na avaliação da substância gastroprotetora.

Palavras-chave: atividade gastroprotetora, índice de lesão ulcerativa, etanol absoluto.

Abstract

The determination of the ulcerative lesions has been performed using different methods. These methodological variations may influence directly in the results and conclusions. In this context, the aim of this work was to study the influence of some variables in gastroprotective methodologies using ethanol as inductor of gastric lesions in rats. It was used Wistar rats that were submitted to administration of the respective treatments and after 30 minutes was administered absolute ethanol. After 1 hour of ethanol administration, animals were sacrificed and their stomachs removed and opened in order to count the lesions and determine of gastric lesions index (ILU). The specimens were placed into formalin and submitted to standard histological process. The variables studied were: drug used as positive control (omeprazole, cimetidine), substance used as a negative control (propylene glycol, water, saline, Tween 80), chemical solvent (Tween 80 and propylene glycol) and type of methodology for determined the ILU (according Gamberini (1991)-GB, and Thieme Szelenyi (1979) - ST and using software EARP). The propylene glycol presented ILU lower than the water group ($p = 0.02$). The other substances showed similar results ($p > 0.05$). These results indicate that propylene glycol has gastroprotective activity, which was confirmed when it was used as a solvent for red propolis. In concerning to the positive control s it was found that cimetidina and omeprazole showed different result $p = (0,006010)$ end the omeprazole was more effective as gastroprotective drugs. The analysis of methods to determine ILU, it was observed that the method EARP showed different results to ST, but similar to GB. Microscopic evaluation of specimens showed information about the intensity and extent of the injury. The results indicate that some variables interfere significantly on the evaluation of gastroprotective drug.

Keywords: gastroprotective activity, ulcerative lesion index, ethanol

1. INTRODUÇÃO

Os estudos que envolvem os mecanismos biológicos atuantes na formação das lesões gástricas são importantes principalmente para desenvolvimento e validação de alternativas terapêuticas. As avaliações de substâncias com potencial gastroprotetor são realizadas em estudos pré-clínicos utilizando-se modelos que procuram estabelecer um padrão de resposta de proteção em função de um controle negativo, ou seja, utilizando uma substância sem atividade gastroprotetora (BARROS *et al.*,

2007; ANDRADE *et al.*, 2007). Nestes modelos geralmente são utilizados como controle negativo a água ou salina. Porém, quando a substância é insolúvel em água, outro solvente deve ser utilizado, sendo necessária a introdução do grupo controle solvente no protocolo. Em estudos preliminares foi observado que o solvente pode apresentar resultados sinérgicos à substância estudada, mascarando o potencial gastroprotetor da mesma (PINHEIRO, 2009)

A inserção de novos grupos experimentais contrapõe as novas diretrizes sobre o uso de animais para experimentação (BRASIL, 2008), as quais preconizam a utilização de um menor número de animais nos experimentos pré-clínicos para produção de resultados conclusivos.

Diversos artigos sobre avaliação gastroprotetora tem sido publicados, sendo observadas divergências metodológicas em relação ao tipo de controle positivo utilizado e metodologia de cálculo das lesões (BARBASTEFANO *et al.*, 2007; BARROS *et al.*, 2007).

Desta forma, o presente trabalho estudou a influência de variáveis nos ensaios biológicos que envolvem a avaliação do potencial gastroprotetor de substâncias em modelo de indução de lesões gástricas por etanol em ratos.

2. Material e Métodos

2.1 Animais: foram utilizados ratos *Novergicus albinus* da linhagem Wistar, machos, pesando 300 ± 50 g, mantidos em condições padronizadas, com ciclo claro-escuro de 12 h, tratados com ração do tipo padrão (Labina) e água *ad libitum*. Comitê de ética

2.2. Ensaio farmacológico: O modelo de indução de lesão gástrica utilizado foi por etanol absoluto seguindo metodologia de Morimoto (1991) com algumas modificações. Os animais foram aleatoriamente separados em grupos (n=6) e após 30 minutos da administração dos respectivos tratamentos, receberam por via oral 1,0 mL de etanol absoluto. Após 1 hora da administração do etanol, os mesmos foram sacrificados e seus estômagos retirados, lavados com solução salina e abertos na sua maior curvatura para contagem das lesões e cálculos do Índice de lesão ulcerativa (ILU).

2.3. Variáveis estudadas

As variáveis estudadas no trabalho encontram-se dispostas na tabela 1. No estudo da variável controle positivo foram utilizados os tratamentos com omeprazol (30

mg.Kg⁻¹) e cimetidina (100 mg.Kg¹). Para avaliação do controle negativo, os animais foram tratados com água, salina 0,9%, Tween 80 15% ou propilenoglicol todos na dosagem de 10 mL.Kg⁻¹ do animal. O propilenoglicol e o Tween 80 também foram utilizados como solventes para o extrato hidroalcolico de própolis vermelha. Nestes grupos experimentais a água foi utilizada como controle positivo para comparação da gastroproteção de cada tratamento e para observação e cálculo do ILU foi empregado o método descrito por Gamberini (1991) - GB.

A avaliação da metodologia de obtenção do índice de lesão ulcerativa (ILU) foi estudada pela observação e comparação dos métodos descritos por Gamberini (1991) – GB, Szelenyi e Thiemer (1979) – ST e por Barros et al. (2007) – EARP, utilizando o Tween 80 como controle negativo..

Tabela 1: Apresentação das variáveis estudadas para avaliar a influência destas nos estudos de gastroproteção.

Variáveis	Grupos	Controle negativo	Método
Controle positivo	Omeprazol	Água	GB
	Cimetidina		
Controle negativo	Propilenoglicol	Água	GB
	Água		
	Tween 80 a 15%		
	Salina 0,9%		
Solventes	Propilenoglicol	Água	GB
	Tween 80		
Metodologias de cálculo de ILU	Gamberini (1991) – GB		
	Szelenyi e Thiemer (1979) -ST	Tween 80	-
	EARP		

2.4. Descrição das metodologias para cálculo do índice de lesão ulcerativa.

Para determinação do índice das lesões ulcerativas (ILU), os cálculos foram realizados por três propostas de metodologias, sendo elas:

2.4.1. Gamberini (1991) - GB: As lesões foram contadas e classificadas de acordo com os números de petéquias (até 10, 20 e 30, com pontuação de 1, 2 e 3 respectivamente), o número e dimensão das lesões (até 1 mm (pontos = nx2) ou

maiores que 1 mm (pontos = $n \times 3$), onde n representa o número das lesões). A presença de hemorragia (1 ponto), perda de pregas (1 ponto) e a alteração da coloração (1 ponto) também foram avaliados. O escore final (ILU) para cada animal foi calculado pela somatória de pontos dos parâmetros acima. Para a determinação da porcentagem de inibição da lesão ulcerativa (% inibição da LU) de cada grupo em relação ao grupo controle, foi utilizada a equação: % inibição LU = (Média do controle negativo - média do tratado) x 100/ média do controle negativo.

2.4.2. Szelenyi e Thiemer (1979): As lesões ulcerativas foram contadas e classificadas como nível 1, 2 e 3, de acordo com o tamanho das lesões, sendo nível 1 lesões menores que 1 mm, nível 2 menores que 2 mm e nível 3 úlceras maiores que 3 mm de extensão. O cálculo do ILU foi realizado pela equação: $ILU = (\text{lesões de nível 1}) + (\text{lesões de nível 2} \times 2) + (\text{lesões de nível 3} \times 3)$. A equação empregada no cálculo (% inibição da LU) foi a mesma utilizada por GB.

2.4.3. Método por análise de imagem computadorizada (BARROS *et al.*, 2007): Após fixação em formol, os estômagos foram digitalizados e as imagens analisadas pelo software "EARP" para mensurar a área das lesões gástricas. As lesões foram classificadas em lesões menores que 1 mm² (nível 1), entre 1 e 3 mm² (nível 2) e maiores que 3 mm² (nível 3). A determinação do ILU realizou-se pela equação: $ILU = 1 \times (n \text{ do nível 1}) + 2 \times (n \text{ do nível 2}) + 3 \times (n \text{ do nível 3})$, onde n representa o número de lesões. A equação empregada no cálculo (% inibição da LU) foi a mesma utilizada por GB.

2.5. Método histológico

Esta forma de avaliação de lesão ulcerativa caracteriza as lesões ulcerativas observando microscopicamente as alterações através de cortes histológicos em lâminas coradas por hematoxilina-eosina.

2.6. Análise estatística

Os escores de ILU obtidos foram comparados através de testes não paramétricos (Mann-Whitney e Kruskal-Wallis), considerando $p < 0,05$. A comparação do ILU dos grupos tratados em relação ao grupo controle negativo foi realizada utilizando teste de Dunnet. Todos os valores de p foram calculados usando o software Statistic 7.0.

3. Resultados

Os valores dos escores de lesão dos grupos tratados com cimetidina e omeprazol utilizados como controle positivo pode ser observado na Tabela 2. Seus resultados demonstraram diferença estatística ($p=0,006643$) entre os grupos estudados, sugerindo uma maior ação gastroprotetora no grupo tratado com omeprazol.

A comparação entre os grupos em relação ao controle negativo utilizado (propilenoglicol, salina, Tween 80 e água) no modelo de indução de lesão ulcerativa por etanol estão apresentados também na tabela 2, demonstrando que apenas o grupo do propilenoglicol apresentou resultados estatisticamente diferentes ao grupo tratado com água ($p=0,0240$).

Tabela 2. Avaliação do ILU e da inibição de LU em relação a diferentes parâmetros, utilizando ratos machos e método de Gamberini et al. (1991) para cálculo do ILU

Parâmetro avaliado	Variáveis	ILU*	Inibição da LU (%) (comparados com a água)
Controle Negativo	Água	12±5 ^a	-
	Salina	8±5 ^{a,b}	35,1
	Tween 80	8±4 ^{a,b}	35,1
	Propilenoglicol	4±4 ^b	67,6 ^{**}
Controle Positivo	Cimetidina	5±3 ^a	60,8 ^{**}
	Omeprazol	1±1 ^b	96,0 ^{**}
Solvente + própolis vermelha	Tween 80	2±2 ^a	81,1 ^{**}
	Propilenoglicol	1±1 ^b	96,0 ^{**}

Letras iguais numa mesma coluna dentro do parâmetro avaliado representam valores estatisticamente semelhantes.

* Valores médios ± desvio padrão

**Apresenta diferença em relação ao grupo água (Dunnet $p<0,05$)

O índice de lesão ulcerativa (ILU) dos grupos tratados com os solventes propilenoglicol e tween 80 utilizando o extrato de própolis vermelha como substância teste apresentaram diferença estatística ($p= 0,0198$), onde o grupo tratado com tween 80 como solvente apresentou mais lesões quando comparado com o propilenoglicol, como pode ser observado na tabela 3.

Tabela 3. Avaliação da atividade gastroprotetora utilizando diferentes métodos para obtenção do ILU

Parâmetro Avaliado	Grupos	Variáveis	ILU*	Inibição da LU (%) (comparados ao Tween 80)
Método de obtenção das lesões ulcerativas	Omeprazol	Gamberini	1±1 ^a	93,8
		Thiemer	0±0 ^a	100,0
		EARP	2±3 ^a	88,8
	Tween 80	Gamberini	8±4 ^{a,b}	-
		Thiemer	4±2 ^a	-
		EARP	16±2 ^b	-

Letras iguais numa mesma coluna dentro do grupo avaliado representam valores estatisticamente semelhantes.* Valores médios ± desvio padrão

A Tabela 4 mostra os percentuais dos índices de lesões ulcerativas analisadas pelo programa EARP e pelo método de Szelenyi e Thiemer (1979). Observa-se que o tween 80 e o omeprazol apresentam diferenças estatísticas nos resultados encontrados.

Tabela 4. Avaliação da área percentual lesada obtida através do software EARP e do índice de lesão ulcerativa (ILU) calculado pela fórmula matemática proposta por Szelenyi e Thiemer (1979).

Animal	Omeprazol		Tween 80	
	Lesão ulcerativa (%)	ILU Thiemer	Lesão ulcerativa (%)	ILU (EARP)
1	0,00	0	4,49	13
2	0,34	6	4,33	13
3	0,00	0	5,49	18
4	1,32	3	10,08	17
5	0,00	0	11,48	17
6	0,00	0	7,08	18

A avaliação histomorfológica caracteriza a área de lesão, em relação a preservação do tecido, áreas hemorrágicas, e profundidade do dano. A figura 1

apresenta a fotomicrografia de secções histológicas nas quais foi possível observar em (A) a profundidade e extensão da lesão ulcerativa da mucosa gástrica. Em (B), a fotomicrografia apresenta um epitélio totalmente preservado sem ocorrências de áreas de lesões ou presença de células inflamatórias, quando tratado com o omeprazol.

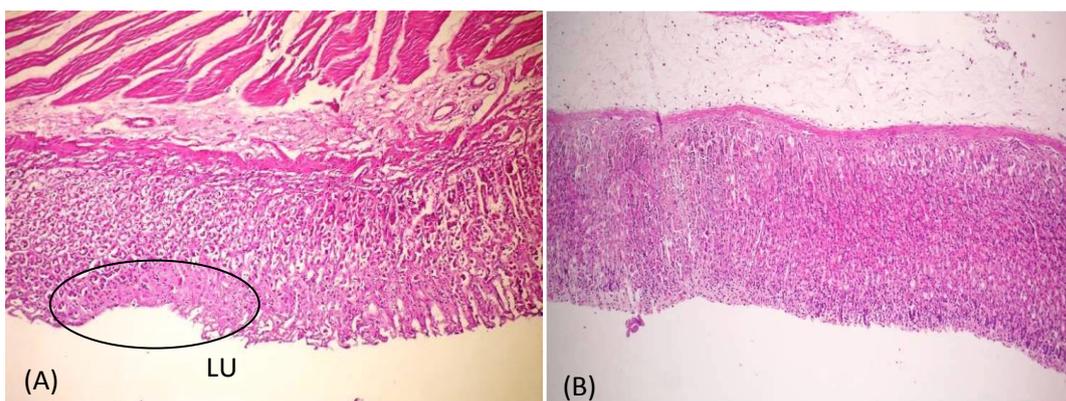


Figura 1. Fotomicrografia das secções histológicas coradas em HE dos estômagos dos animais submetidos à agressão por etanol. (A) Tween 80 (B) Omeprazol. LU: área de lesão ulcerativa. Aumento 40 x.

4. Discussão

Diversos estudos pré-clínicos são realizados na tentativa de descobrir os mecanismos de ação e efeito gastroprotetor de compostos naturais contra lesões ulcerativas provocadas por etanol. Nestes experimentos faz-se necessário o uso de substâncias ativas que servem como padrão de excelência para avaliação do método e comparação com a substância teste. Geralmente, as substâncias utilizadas são aquelas comercialmente disponíveis e que possuem a melhor resposta farmacológica para o estudo proposto e são designadas controle positivo. Os principais fármacos utilizados como controle positivo nestes experimentos são os que pertencem à classe dos inibidores de receptores de histamina tais como a ranitidina e cimetidina (Silvério, *et al* 2008; Coelho, *et al* 2009) e os inibidores da bomba de prótons como o omeprazol e lansoprazol (Kushima, 2006; Barros, *et al* 2007; Andrade *et al* 2007; Twardowschy, 2007).

No presente trabalho, foi encontrada uma diferença estatística entre o omeprazol e a cimetidina, observada na tabela 2. Este resultado pode ser explicado porque os inibidores H2 se ligam de modo reversível aos receptores H2 da célula

parietal, inibindo a resposta secretória ácida desses receptores. Já os inibidores da bomba de prótons (IBP), são substâncias benzimidazólicas que inibem seletiva e completamente a bomba de prótons H^+K^+ ATPase na membrana da célula parietal. Com isso, a secreção gástrica ácida é suprimida em resposta a todos os agentes estimulantes até que novas moléculas da bomba sejam sintetizadas. (Guimarães et al 2006). FILHO et al 2006 comentam ainda que os IBP mantêm o pH gástrico acima de 4,0 na maior parte do tempo, e por período mais longo, quando comparados aos anti- H_2 . Desta forma, os IBP, como o omeprazol, parecem ser substâncias mais efetivas e, portanto, mais apropriadas para uso como controle positivo para gastroproteção.

Na natureza existem compostos que possuem capacidade de solubilização em água e outros que não apresentam esta característica. Os compostos que não se dissolvem em água necessitam de uma substância apolar para efetivar sua dissolução. O propilenoglicol e o tween 80 são solventes cuja finalidade é justamente dissolver compostos não miscíveis em água. Outra propriedade importante destes solventes utilizados em experimentos é que apresentem o mínimo de ação sinérgica com a substância testada para não haver interferência na avaliação dos resultados.

No presente estudo, o extrato de própolis vermelha foi a substância avaliada no experimento envolvendo a indução de lesões ulcerativas por etanol absoluto com a finalidade de testar seu efeito gastroprotetor. Para tanto, o EHPV foi dissolvido com o propilenoglicol e tween 80 cujos resultados demonstraram que o propilenoglicol apresentou um comportamento que aponta para uma ação sinérgica com o EHPV, quando comparado com o tween 80. Este comportamento foi ratificado quando se avaliou a ação destes mesmos solventes testados como controle negativo juntamente com a água e salina, pois, observou-se que o propilenoglicol apresentou um índice de lesão ulcerativa menor do que o tween 80.

Sendo assim percebe-se que o propilenoglicol, embora apresente propriedades como solvente, estabilizador e umectante tendo ampla utilização nas indústrias de cosméticos, alimentos e produtos farmacêuticos, interferiu na avaliação da atividade gastroprotetora do EHPV demonstrando que o tween 80 é um solvente mais inerte, ou seja, oferece resultados mais confiáveis por apresentar menor grau de interferência.

É importante destacar que a lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, determina que os experimentos com uso de animais devem priorizar o menor número destes para encontrar resultados conclusivos. Desta forma, o uso de solventes inertes que apresentem resultados semelhantes à água proporciona uma condição favorável para

a diminuição de um grupo experimental, sendo necessário apenas a experimentação com o grupo solvente, eliminando o grupo água. Neste caso, o grupo solvente servirá como grupo controle negativo.

A obtenção do índice de lesões ulcerativas tem sido realizada utilizando como critério de avaliação do dano na mucosa gástrica por diferentes parâmetros e fórmulas matemáticas (BARROS, *et al* 2007; ANDRADE *et al* 2007;).

O método de Szelenyi e Thiemer (1979) realiza a observação macroscópica e apenas categoriza as lesões em tamanhos menores que 1 mm, entre 1 e 3 mm e maiores que 3 mm, calculando o ILU em função do tamanho e número de lesões. Este método é extremamente frágil, pois avalia macroscopicamente lesões que podem ser menores que 1 mm, muitas vezes impossível de serem detectadas a olho nu. Foi observado que avaliações realizadas com um produto eficiente, como por exemplo o omeprazol, o método de Szelenyi e Thiemer (1979), não produziu resultados diferentes dos demais métodos propostos ($p > 0,05$). Porém quando o estômago apresenta uma maior área lesada, o método influencia nos resultados obtidos observado na tabela 4. Portanto, pode-se concluir que o cálculo de ILU por método de observação macroscópica, onde apenas o número e tamanho de lesões são observados não é sensível o suficiente para caracterizar e diferenciar o dano na mucosa gástrica.

Outra metodologia que vem sendo utilizada recentemente envolve o uso de software, o qual se fundamenta por limitar os pontos de lesão por diferença de coloração e calcular a área lesada. Desta forma é possível avaliar a área lesada em função da área total do estômago. Este dado é de extrema importância para a avaliação gastroprotetora, pois estima um valor percentual da área lesada, podendo gerar comparações paramétricas, diminuindo a subjetividade da análise e quantificando a variável avaliada. Porém, neste método novamente apenas a lesão é avaliada, sendo que a preservação das características morfológicas do estômago e a presença de hemorragia não são observadas. Além disso, o método para calcular o ILU é realizado com a mesma fórmula matemática utilizada por Szelenyi e Thiemer (1979). Na tabela 5 foi possível observar que a área lesada não está coerente com o ILU, onde tem-se casos de estômagos com 5,49% de lesão e ILU igual a 18, e outro com área de lesão bem maior, correspondente a 10,08% do estômago e ILU menor que o anterior. (ILU=17).

A fórmula matemática proposta por Gamberini (1991) utiliza como critério para o cálculo do ILU a presença de hemorragia, petéquias e a preservação das células. Este método, apesar de utilizar uma avaliação macroscópica, também envolvendo

observação de lesões menores que 1 mm, coloca como parâmetro de avaliação a condição geral do órgão.

É importante salientar que a análise microscópica através dos cortes histológicos mostra áreas de lesões, presença de células inflamatórias, profundidade da lesão com uma descrição mais detalhada sobre a lesão o que agrega um valor ao diagnóstico muito maior na avaliação de lesões ulcerosas. Em muitos trabalhos sobre gastroproteção não são realizados os métodos histológicos, baseando suas conclusões de acordo com análises macroscópicas, calculando o índice da lesões através de fórmulas matemáticas ou ainda mais recentemente, por aplicação de software para analisar imagens digitalizadas e produzem resultados que expressam índice de lesões gástricas. (BARROS *et al* 2007; ANDRADE *et al* 2007; ROLDÃO *et al* 2008).

5. Conclusão:

A metodologia utilizada para obtenção dos parâmetros para cálculo do índice de lesão gástrica e os critérios utilizados podem interferir nos resultados utilizando a mesma amostra, o que caracteriza um viés metodológico importante.

A metodologia EARP apresentou melhores condições para obtenção do tamanho e número das lesões, sendo a área de percentual da lesão um valor extremamente importante para comparar os grupos testados.

O propilenoglicol apresentou atividade sinérgica com o extrato hidroalcoólico da própolis vermelha.

6. Referências

- ANDRADE, S. F., LEMOS, M., COMUNELLO, E., NOLDIN, V.F., FILHO, V.C., NIERO, R. Evaluation of the antiulcerogenic activity of *Maytenus robusta* (Celastraceae) in different experimental ulcer models. **Journal of Ethnopharmacology** 113, 252–257. 2007.
- BARBASTEFANO, V., COLA, M., LUIZ-FERREIRA, A., FARIAS-SILVA, E., HIRUMA-LIMA, C.A., RINALDO, D., VILEGAS, W., SOUZA-BRITO, A.R.M. Vernonia polyanthes as a new source of antiulcer drugs. **Fitoterapia**. 78, 545–551, 2007.
- BARROS, M.P; SOUSA, J.P.B.S; BASTOS, J.K; ANDRADE, S.F. Effect of Brazilian green propolis on experimental gastric ulcers in rats. **Journal of Ethnopharmacology** 110, 567–571, 2007.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos. 1 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2008.
- GAMBERINI, M. T.; SKORUPA, L. A.; SOUCCAR C.; LAPA, A.J. Inhibition of gastric secretion by a water extract from *Baccharis triptera*, Mart. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 86: p.137-139, 1991.
- GUIMARÃES, E. V.; MARGUET, C.; CAMARGOS, P. A. M. Tratamento da doença do refluxo gastroesofágico, **Jornal de Pediatria**, 82(5), p. s133-s145 2006.
- KUSHIMA, Helio. **Avaliação da atividade antiulcerogênica dos extratos e frações das folhas de *Davilla elliptica* St. Hil. e *Davilla nitida* (Vahl) Kubitzki (DILLENIACEAE)**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2006.
- MORIMOTO, Y.; SHIMOHARA, K.; OSHIMA, S.; SUKAMOTO, T. Effects of the new antiulcer agent KB-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of trepenone and cimetidine, **Japan J. Pharmacol.**, 57, p.497- 505, 1991.
- PINHEIRO, M.S. **Avaliação da atividade antimicrobiana e citoprotetora gástrica dos extratos de mangaba, caju e própolis vermelha**. Dissertação de Mestrado, UNIT. ARACAJU, SE. BRASIL. 2009.
- ROLDÃO, E.F., WITAICENIS, A., SEITO, L.N., HIRUMA-LIMA, C.A., DI STASI, L.C. Evaluation of the antiulcerogenic and analgesic activities of *Cordia verbenacea* DC. (Boraginaceae) **Journal of Ethnopharmacology**, 2008).
- SZELENYI, I.; THIEMER, K. Distention ulcer as a model for testing of drugs for ulcerogenic side effects. **Arch. Toxicol.** p. 41, 99-105, 1978.
- TWARDOWSCHY, A **Vias envolvidas no mecanismo de ação do efeito gastroprotetor das cascas de *Tabebuia avellanedae* Lorentz ex Griseb (Bignoniaceae)**. Dissertação de mestrado em Farmacologia. UFP. Paraná. Curitiba. Brasil, 2007.

4. CONCLUSÃO GERAL

Após o desenvolvimento do trabalho concluiu-se que:

O EHPV apresentou atividade gastroprotetora principalmente na dose de 500mg. kg⁻¹ nos modelos testados para indução de lesão gástrica.

O modelo de ligadura de piloro demonstrou que uma das propriedades do EHPV está relacionada com a secreção de muco na atividade gastroprotetora.

A escolha da metodologia de cálculo para obtenção de índice de lesão pode produzir resultados diferentes comprometendo a avaliação gastroprotetora da substância testada.

Quando as lesões gástricas são pouco visíveis no exame macroscópico, a microscopia passa a ser um referencial na interpretação da atividade gastroprotetora.