

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E
CITOPROTETORA GÁSTRICA DOS EXTRATOS DE
MANGABA, CAJU E PRÓPOLIS VERMELHA**

MALONE SANTOS PINHEIRO

ARACAJU
Janeiro – 2009

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E
CITOPROTETORA GÁSTRICA DOS EXTRATOS DE
MANGABA, CAJU E PRÓPOLIS VERMELHA**

Dissertação 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.

MALONE SANTOS PINHEIRO

**Orientadores: Profa. Dra. Francine Ferreira Padilha
Profa. Dra. Juliana Cordeiro Cardoso**

ARACAJU
Janeiro – 2009

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E CITOPROTETORA GÁSTRICA DOS
EXTRATOS DE MANGABA, CAJU E PRÓPOLIS VERMELHA**

MALONE SANTOS PINHEIRO

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:

Francine Ferreira Padilha, D.Sc.
Orientadora

Juliana Cordeiro Cardoso, D.Sc.
Orientadora

José Carlos Tavares de Carvalho, D.Sc.
Examinador

Sara Cuadros Orellana, D.Sc.
Examinadora

Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior, D.Sc.
1º Suplente

Leonardo Rigoldi Bonjardim, D.Sc.
2º Suplente

ARACAJU

Janeiro – 2009

Dedico este trabalho aos meus filhos Isabella e Victor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me guiado pelo caminho certo até que eu pudesse atingir esse objetivo.

À Universidade Tiradentes, pela formação e oportunidade de desenvolvimento profissional, sempre acreditando em meu potencial, me impondo desafios a serem vencidos.

A meus avós, Adauto e Dalva, e também à minha mãe, que sempre estiveram presentes em todas as fases da minha vida e ajudaram a superar todos obstáculos que nela foram aparecendo.

À minha esposa Kariny, por estar ao meu lado e me apoiar em momentos difíceis desta jornada e aos anjinhos de minha vida, Isabella e Victor.

A meus tios Toni, Patrícia e Ivanildo, por incentivarem a minha vida acadêmica e profissional e até muitas vezes indicando caminhos que foram essenciais para esta vitória.

Ao Instituto de Tecnologia e Pesquisa, pelo acolhimento e desenvolvimento do pensamento científico, mostrando um mundo até então desconhecido.

Ao Prof. Dr. Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior pelas oportunidades proporcionadas, por acreditar no meu potencial desde o início, na graduação, sendo peça fundamental para a concretização desse momento especial.

À minhas orientadoras Juliana e Francine, pela paciência e apoio, sempre esclarecendo todos os pontos obscuros até a conclusão deste trabalho.

Aos meus amigos Ana Guedes, Ana Paula, Ana Claudia, Luciana e Alessandra que caminharam juntos nesses momentos difíceis, sempre apoiando e incentivando, fazendo me sentir mais forte e preparado para concluir essa jornada.

Agradeço a Matheus Mangaba, Vandinha e Roneval Félix que contribuíram diretamente para concretização desse trabalho.

Em especial a Ana Roseli pelo empenho e participação fundamental na construção e desenvolvimento desse trabalho sendo também responsável pelo seu sucesso.

Para compreender que o céu é azul por toda parte,
não é preciso dar a volta ao mundo.

Goethe

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	12
CAPÍTULO 1	
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
1.1 ÚLCERAS GÁSTRICAS	14
1.1.1 Dados epidemiológicos	14
1.1.2 Etiologia	14
1.1.3 <i>Helicobacter pylori</i>	15
1.1.4 Causas não infecciosas	18
1.2 TERAPIA MEDICAMENTOSA	19
1.2.1 Antibióticos	20
1.2.2 Citoprotetores	22
1.3 PRODUTOS NATURAIS	24
1.3.1 Mangaba	24
1.3.2 Caju	25
1.3.3 Própolis vermelha	26
REFERÊNCIAS	28
CAPÍTULO 2	
ATIVIDADE GASTROPROTETORA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE PRÓPOLIS VERMELHA	34
2.1 INTRODUÇÃO	35
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	37
2.2.1 Amostra	37
2.2.2 Obtenção do extrato	37
2.2.3 Determinação dos flavonóides	37
2.2.4 Avaliação da atividade antioxidante	38
2.2.5 Avaliação da atividade anti-Hp	38
2.2.6 Avaliação da atividade gastroprotetora	39
2.2.7 Análise estatística	41
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
2.4 CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS	49

CAPÍTULO 3	
AVALIAÇÃO DA POTENCIAL GASTROPROTETOR DO	
EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE MANGABA E CAJU	53
3.1 INTRODUÇÃO	54
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	55
3.2.1 Amostra	55
3.2.2 Preparo dos extratos	56
3.2.3 Determinação da concentração de flavonóides	56
3.2.4 Avaliação da atividade antioxidante	56
3.2.5 Avaliação da atividade anti-HP	57
3.2.6 Avaliação do potencial gastroprotetor	58
3.2.7 Avaliação histomorfológica	59
3.2.8 Análise estatística	60
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
3.4 CONCLUSÃO	66
REFERÊNCIAS	67
CONCLUSÃO FINAL	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Índices de resistência do Hp frente aos anitbióticos metronidazol e claritromicina em diferentes localidades	20
Tabela 2	Protocolos terapêuticos para o combate ao Hp	21
Tabela 3	Produtos naturais com comprovada ação anti-Hp	22
Tabela 4	Grupos tratados e seus correspondentes esquemas de dose	39
Tabela 5	Parâmetros para contagem do índice de lesões ulcerativas pelo método A	40
Tabela 6	Parâmetros para classificação do índice de lesões ulcerativas pelo método B	41
Tabela 7	Valores médios de ILU seguido de erro padrão e percentuais de inibição de lesão ulcerativa por diferentes métodos	44
Tabela 8	Grupos de tratamentos e esquema de doses utilizadas	58
Tabela 9	Parâmetros para contagem do índice de lesões ulcerativas pelo método A	58
Tabela 10	Parâmetros classificatórios do índice de lesões ulcerativas pelo método B	59
Tabela 11	Valores médios, erro de padrão de ILU e percentuais de inibição da lesão ulcerativa por diferentes métodos	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Rota metabólica do processo de proteção de Hp	17
Figura 2	Avaliação histomorfológica: (a) grupo salina, (b) grupo propilenoglicol, (c) grupo cimetidina, (d) grupo omeprazol, (e) grupo própolis; (1) aumento de 100X, (2 e 3) aumento de 400X; Legenda: região de granulação (rg), lâmina própria (lp), camada muscular da mucosa (mm), hemorragia (hm), epitélio foveolar (ef)	47
Figura 3	Avaliação histomorfológica: (a) grupo salina, (b) grupo omeprazol, (c) grupo mangaba, (d) grupo cimetidina, (e) grupo caju; (1) aumento de 100X, (2 e 3) aumento de 400X	63

RESUMO

Malone Santos Pinheiro

A úlcera péptica é um importante agravo à saúde pública acometendo cerca de 10% da população mundial. A pesquisa com plantas que possuam ação antimicrobiana e/ou gastroprotetora torna-se de suma importância, posto que pode auxiliar no tratamento dessa doença. Estudos com própolis vêm sendo realizados para avaliar seu potencial como antimicrobiano, sendo que a variedade vermelha tem mostrado ação contra diferentes microrganismos, porém apenas a variedade verde foi estudada até o momento como agente gastroprotetor. Além deste apiterápico, outros produtos naturais como mangaba e caju são utilizados popularmente no combate a úlcera, entretanto o fruto da mangabeira e o pseudofruto do cajueiro foram pouco avaliados cientificamente com esse intuito. O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação gastroprotetora dos extratos brutos destes vegetais, bem como da própolis vermelha. Os extratos foram preparados por maceração usando etanol 70% como solvente e o teor de flavonóides e atividade antioxidante foram determinados. O potencial anti Hp foi avaliado pelo método de difusão em poços e a atividade gastroprotetora foi determinada após exposição do animal ao extrato seguido de produção da lesão utilizando álcool etílico. Após uma hora, os animais foram sacrificados e foi realizada a avaliação macroscópica e o índice de inibição de lesões ulcerativas foi calculado utilizando duas metodologias. A avaliação histopatológica do estômago foi realizada após preparação das secções em HE. Os resultados obtidos acerca do teor de flavonóides foram de 0,20%, 0,31% e 0,15% para os extratos de mangaba, própolis vermelha e caju, respectivamente. Já quanto a atividade antioxidante obtiveram-se IC₅₀ de 0,294 mg/mL para a própolis vermelha, 0,597mg/mL para a mangaba e 0,285 mg/mL para o caju. Para atividade antimicrobiana dos extratos em estudo, foi observado que nas condições desse experimento, que somente a própolis vermelha apresentou um halo de inibição com cerca de 13±2 mm. Para a avaliação segundo método A o extrato de mangaba apresentou inibição de 46,15%, e a própolis vermelha 92,3% das lesões. Na metodologia B foi encontrado 76,92% para mangaba e 100% de inibição para própolis vermelha. A própolis vermelha apresentou excelente potencial citoprotetor.

Palavras-chave: Úlcera péptica; extratos brutos; *Helicobacter pylori*; gastroproteção.

ABSTRACT

Malone Santos Pinheiro

The peptic ulcer is an important public health disorder affecting approximately 10% of the world population. The research with plants that have antimicrobial action and / or with gastric protection becomes in short importance, since it can assist in the treatment of this disease. Studies are being made with propolis to evaluate its potential as antimicrobial, and the red variety has shown action potential against various microorganisms, but only the green variety has been studied so far as gastric protector agent. Besides this apiterapic, other natural products such as cashew and mangaba are popularly used to combat the ulcer, but the mangabeira fruit and cashew pseudo fruit have not been scientifically evaluated yet. The objective was to assess the gastric protector action of these plants crude extracts, and the red propolis as well. The extracts were prepared by maceration using 70% ethanol as solvent and content of flavonoids and antioxidant activity were determined. The potential anti Hp was evaluated by the method of distribution and activity in wells gastric protector was determined after exposure of the animal to extract followed by production of the lesion using alcohol. After one hour the animals were sacrificed and macroscopic assessment was performed and the index of inhibition of ulcerative lesions was calculated using two methodologies. Histopathologic evaluation of the stomach was performed after preparation of the sections in HE. The results about the content of flavonoids were 0.2%, 0.31% and 0.15% for the extracts of mangaba, cashew and red propolis, respectively. Regarding the antioxidant activity were obtained IC₅₀ of 0294 mg / mL for red propolis, 0265 mg / mL for mangaba and 0285 mg / mL for cashew. For antimicrobial activity of the extracts under study, it was observed that in the conditions of this experiment, only the red propolis showed a halo of inhibition of about 13 ± 2 mm. For the second method the evaluation of the mangaba extract showed inhibition of 46.15% and red propolis 92.3% of lesions. On method B was found in 76.92% for mangaba and 100% inhibition for red propolis. Red Propolis showed excellent cytoprotectant potential.

Key-words: Peptic ulcer, crude extracts, *Helicobacter pylori*, gastric protection.

INTRODUÇÃO

A úlcera péptica é um agravo provocado por diversos fatores com sintomatologia ligada aos reflexos orgânicos como: dores estomacais, náuseas e hemorragias. Esse tipo de lesão leva à necrose que acomete toda a superfície da mucosa gástrica e também a camada muscular (HALTER *et al.*, 1995).

As lesões podem ser resultado da ação do ácido clorídrico e da pepsina naturalmente presentes no estômago (WALLACE, 2001). Contudo, outros fatores agressores endógenos em associação a fatores exógenos predisponentes relacionados às condições de vida como estresse, fumo, álcool, uso contínuo de drogas antiinflamatórias não-esteroidais, ingestão de determinados alimentos, infecção por *Helicobacter pylori* (Hp) e predisposição genética podem atuar conjuntamente reduzindo a defesa da mucosa gástrica (BRUNTON, 1996; JOHNSON e JOHNSON, 1997; WOLFE e SANCHES, 2000; WALLACE, 2001).

A relação etiopatogênica entre Hp, a gastrite crônica e a úlcera péptica tem sido demonstrada desde 1983 (CANIZARES *et al.*, 2004). A erradicação deste microrganismo associado a essas doenças é realizada através de associações entre antibióticos sintéticos como metronidazol, claritromicina, tetraciclina e amoxicilina em concomitância a um inibidor de bomba de prótons (CANIZARES *et al.*, 2004). Entretanto, a resistência deste agente frente aos antibióticos é crescente e tem se tornado um problema em todo o mundo, sendo um fator adverso ao tratamento e que gera reincidivas das úlceras pépticas (OCHI *et al.*, 2005).

As úlceras gástricas podem também ser desencadeadas por fatores não infecciosos e desta forma o seu tratamento está ligado a uma mudança na conduta de vida relacionada aos hábitos alimentares, ao não uso de bebidas alcoólicas, abandono do tabagismo e excepcionalmente pode haver a necessidade de psicoterapia e uso de tranqüilizantes (OCHI *et al.*, 2005).

A pesquisa com produtos naturais que possuam ação antimicrobiana e potencial gastroprotetor vem sendo realizada com o intuito de descobrir novas substâncias que possam auxiliar no tratamento desta doença (KUBO, J *et al.*, 1999; LIU *et al.*, 2002; NOSTRO *et al.*, 2006; BARROS *et al.*, 2008).

Os recursos naturais no Brasil são inúmeros, bem como os relatos de ação farmacológica das plantas existentes. Dentre os produtos naturais com potencial fitoterápico utilizados popularmente contra úlcera e gastrite, encontram-se a própolis, a mangaba e o caju que possuem relatos comprovando a sua ação antiinflamatória, antimicrobiana, antioxidante e cicatrizante (VARGAS *et al.*, 2004; NOGUEIRA e SAMPAIO, 2006).

A própolis vermelha é responsável, nas colméias, pela impermeabilização, isolamento térmico, vedação e tratamento anti-séptico. Na medicina popular, tem sido usada por demonstrar atividade antimicrobiana, antiinflamatória, cicatrizante, anestésica, antioxidante e até mesmo antitumoral (PARK *et al.*, 1998; MANARA *et al.*, 1999; VARGAS *et al.*, 2004).

A mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) possui um fruto rico em vitamina C, e vem sendo utilizado amplamente pela indústria de alimentos. Na medicina popular, a infusão da casca do caule da mangabeira tem sido útil no tratamento da hipertensão, úlceras gástricas, distúrbios estomacais, e doenças inflamatórias (MORAES *et al.*, 2008).

O cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) é uma planta tropical difundida em todo o Brasil, principalmente no Norte e Nordeste. A literatura cita que esta planta possui ação anti-viral, antimicrobiana e atividade antiinflamatória, sendo esta ação relacionada aos ácidos anacárdicos que é relatado como principal composto bioativo (RAZALI *et al.*, 2008).

O presente estudo teve como objetivo a avaliação do extrato hidroetanólico da própolis vermelha, dos extratos brutos do fruto da mangabeira e pseudofruto do caju quanto à atividade antioxidante, teor de flavonóides, potencial gastroprotetor e atividade antimicrobiana frente ao Hp.

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 ÚLCERAS GÁSTRICAS

1.1.1 Dados epidemiológicos

A úlcera péptica é um agravo que afeta entre 8 a 10% da população dos países industrializados. No continente americano quase 2 milhões de adultos têm úlcera ativa em alguma fase da vida e somente nos Estados Unidos 4 milhões de casos de úlcera foram estimados, sendo que 500.000 novos casos são registrados anualmente (FERREIRA, 2005).

Esse distúrbio alcança aproximadamente entre 11 a 20% dos homens e 8 a 11% das mulheres causando elevadas perdas econômicas e gastos com saúde devido à baixa produtividade do trabalhador, atividades limitadas, visitas médicas e hospitalizações (FERREIRA, 2005).

Apesar da diminuição na frequência de úlcera péptica causada pela infecção do *Helicobacter pylori* (Hp), essa lesão permanece como um dos principais problemas de saúde no mundo. No Brasil, os casos relacionados não são rigorosamente notificados, dificultando a obtenção de dados epidemiológicos confiáveis (SHIOTANI e GRAHAM, 2002).

1.1.2 Etiologia

A úlcera péptica é uma patologia caracterizada pelo aparecimento de lesões ulcerosas agudas ou crônicas que expõe a mucosa gástrica à ação agressiva do suco ácido-péptico (CALAM e BARON, 2001).

Vários mecanismos estão implicados na patogênese das lesões gástricas, agindo sinergicamente ou não na produção das lesões. Assim, fatores intrínsecos tais como

aumento da secreção ácida gástrica e da pepsina, diminuição do fluxo sanguíneo, supressão de prostaglandina endógena, inibição do crescimento e proliferação celular da mucosa e alteração da motilidade gástrica podem ocasionar esta doença. Por outro lado, fatores externos já têm sido descritos na literatura como agentes promotores das lesões. Dentre eles podem ser citados a presença de Hp e de radicais livres. Todos esses fatores participam dos mecanismos envolvidos na ulcerogênese e se constituem alvo de ação terapêutica (HIRSCHOWITZ *et al.*, 1995; WOLFE e SANCHES, 2000; ANDREOLI, 2000).

1.1.3 *Helicobacter pylori*

Atualmente o Hp é o principal fator causal da gastrite crônica e está associado ao risco de desenvolvimento de úlcera peptídica, linfomas do tipo MALT e câncer gástrico, sendo portanto a primeira bactéria classificada e definida como carcinogênica pela Agência Internacional de Pesquisa do Câncer e pela Organização Mundial de Saúde (IARC/WHO) (AMIEVA e EL-OMAR, 2008).

Trata-se de um bastonete gram-negativo, flagelado em forma de espiral, que exige atmosfera microaerófila para seu crescimento e costuma colonizar o estômago e duodeno humano. Apesar de o estômago ser um ambiente inóspito para a colonização bacteriana devido ao seu pH ácido, o Hp consegue se desenvolver através de uma intensa atividade da urease que eleva o pH desse local tornando-se um micro ambiente adequado para o seu desenvolvimento (USTUN *et al.*, 2006).

A transmissão desse microrganismo é inter-humana, sendo as principais rotas transmissionais a fecal-oral e oral-oral. A prevalência da infecção é alta em populações com baixas condições sócio-econômicas, principalmente em famílias que residem em condições de aglomeração. Em países desenvolvidos a média de colonização pelo Hp está próximo aos 40%, podendo elevar-se a 80% em regiões pobres destes países e nos países de economia periférica. A soroprevalência aumenta progressivamente com a idade, não havendo diferenças significativas entre os gêneros. A infecção não é autolimitada e pode persistir por muitos anos e acompanhar o hospedeiro durante décadas ao longo da vida, muitas vezes de forma assintomática, exceto quando desencadeia uma inflamação crônica na mucosa gástrica (BONAMIGO *et al.*, 1999; SIQUEIRA *et al.*, 2007).

Embora metade da população mundial esteja infectada por este microrganismo, 80% desses indivíduos permanecem sem nenhuma evidência clínica de doença e somente uma pequena percentagem desenvolve patologias relacionadas à sua presença (AMIEVA e EL-OMAR, 2008).

Sabe-se que essa bactéria ocasiona uma importante inflamação aguda e crônica da mucosa gástrica que, quando não tratada, raramente é eliminada de forma espontânea. Atualmente é reconhecida como principal fator de risco para o desenvolvimento de úlceras gastroduodenais por estar presente em 95% dos casos de úlceras duodenais e 60-80% das gástricas (PASSOS, 2007; LINZ e SCHUSTER, 2007).

Os mecanismos que promovem o desenvolvimento de doenças a partir do Hp ainda são controversos, porém estima-se que fatores relacionados à bactéria, ao hospedeiro e ao ambiente contribuem na evolução desses agravos. Destacam-se como principais fatores associados à patogenicidade desse microrganismo, a resposta inflamatória da mucosa e alterações da secreção gástrica (SIQUEIRA *et al.*, 2007).

Segundo Pagana e Pagana (2001) o Hp coloniza a mucosa antral e o fundo do estômago sem invadir o epitélio. Apesar de todas as defesas do organismo humano, a bactéria consegue sobreviver em ambiente hostil e causar danos teciduais. A capacidade que o Hp têm de provocar lesão na mucosa gastroduodenal está intimamente relacionada à sua capacidade de adaptar-se ao ambiente inóspito que é o ambiente gástrico, com seus inúmeros mecanismos de defesas, que dificultam a colonização de outros microrganismos.

Esta capacidade de “adaptação” do Hp deve-se a algumas propriedades que lhe são inerentes e que conferem a sua patogenicidade. Destaca-se entre elas a sua morfologia espiralada ou em “S” com extremidades arredondadas, que juntamente com a presença dos flagelos, garantem à bactéria boa mobilidade facilitando a penetração no muco (MOORE, 1994).

O Hp produz várias proteínas que parecem mediar ou facilitar seus efeitos deletérios sobre a mucosa gástrica (MARTINS *et al.*, 2002). Foram identificadas algumas proteínas que são necessárias à colonização da mucosa gástrica pela bactéria, incluindo proteínas ativas no transporte do organismo à superfície da mucosa, como por exemplo, a flagelina que está codificada no gene *fla A* e *fla B* (EATON *et al.*, 1996).

Quando presente na mucosa gástrica, a bactéria induz a uma hipocloridria transitória, por meio de um mecanismo ainda não bem elucidado. A “resistência” ao ácido clorídrico é de vital importância na sua patogênese, uma vez que, sem esse atributo biológico, a bactéria não teria condições de colonizar essa região (FREDERICK e RICHARD, 2002).

A enzima urease, produzida por esse microrganismo, altera o micro-ambiente gástrico, facilitando a colonização, em virtude da capacidade da mesma de promover a hidrólise da uréia, presente em condições fisiológicas no suco gástrico, levando à produção de amônia (REKTORSCHKEK *et al.*, 1998). A amônia atua como receptor de íons hidrogênio, gerando pH neutro no exterior da bactéria, o que confere ao Hp “resistência” à acidez gástrica (LADEIRA *et al.*, 2003) (Figura 1). A aderência ocorre por via de interação entre os glicolipídeos da superfície celular e as adesinas específicas do Hp (FREDERICK e RICHARD, 2002). As reações envolvidas neste mecanismo de proteção estão apresentadas na Figura 1.

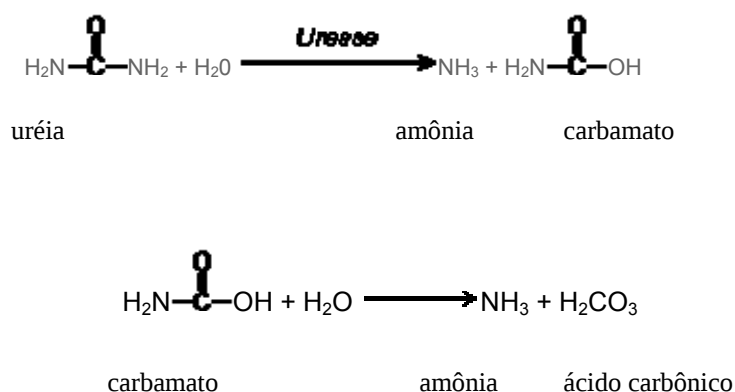


Figura 1 – Rota metabólica do processo de proteção de Hp

Subseqüentemente, a amônia equilibra-se com água, formando hidróxido de amônio, o que origina um rápido aumento de pH. Uma vez atingida a mucosa gástrica, o Hp causa lesão tecidual, em um complexo mecanismo de eventos, os quais dependem de ambos, o hospedeiro e a bactéria. Apesar da semelhança com outras bactérias Gram negativas os lipopolissacarídeos presentes na parede celular do gênero *Helicobacter* possui características próprias, como baixa atividade imunológica, o que provavelmente contribui para a manutenção da infecção (MORAN, 1996).

Esses lipopolissacarídeos mediam a ligação entre a bactéria e a laminina o que possivelmente contribui para a perda de integridade da mucosa gástrica, sendo a produção de proteínas patogênicas outro fator que contribui para a lesão celular da mucosa (MARTINS *et al.*, 2002).

Estas propriedades imunogênicas do Hp induzem a uma reação inflamatória de caráter neutrofílico, a qual normalmente resulta em manifestações clínicas da infecção. Este processo é mediado por fatores do hospedeiro, como as interleucinas 1, 2, 6, 8 e 12;

interferon- δ ; fator- α de necrose tumoral; linfócitos T e B e células fagocitárias. Como resultado destas reações, o Hp altera a secreção gástrica normal (GO e CROWE, 2000).

1.1.4 Causas não infecciosas

Além da etiologia infecciosa, a instalação da úlcera gástrica pode ter outros fatores extrínsecos relacionados como maus hábitos alimentares, estresse, etilismo e tabagismo, que geram a hipercloridria, deixando a mucosa desprotegida (ANDREOLI, 2000).

Em estudo realizado por Sintès *et al.* (1995), foi observada a correlação entre o consumo de café e o tabagismo com o desenvolvimento da doença péptica. O jejum prolongado também surgiu como fator desencadeante da úlcera gástrica, haja vista que proporciona um maior contato da secreção ácida do estômago com a mucosa.

A predisposição genética e fatores comportamentais como o estresse ainda sinalizam como facilitadores para o desenvolvimento da patologia em estudo (MARQUES, 2002).

O abuso de bebidas alcoólicas, álcalis e ácidos fortes, anticorpos, aumento no número de linfócitos e intoxicação alimentar também podem contribuir para o agravamento do quadro (CAVATAIO *et al.*, 1996).

O etanol é considerado um agente irritante da mucosa gástrica, o qual destrói a camada de muco e o bicarbonato, que atuam na proteção da mucosa gástrica contra o ácido clorídrico e outros agentes agressores. Essa substância atua bloqueando a citoproteção gástrica por precipitação das proteínas, liberação de radicais livres e redução da concentração de compostos sulfidrilas nas células da mucosa (MELO-JUNIOR, *et al.*, 2006; PACHECO *et al.*, 2006).

Compostos como histamina, acetilcolina e gastrina estimulam a produção de ácido clorídrico pelas células parietais do estômago no momento de distensão da câmara gástrica modificam o pH intra-luminal. Para haver um equilíbrio na produção do suco gástrico e do pH local, ocorre um *biofeedback* negativo estimulado pela somatostatina que é liberada pelas células D do antro e do fundo do estômago (BATISTA, 2003).

A presença do conteúdo alimentar também é responsável pelo estímulo de mecanismos de proteção da barreira mucosa, assim como a secreção do muco e bicarbonato pela mucosa e

liberação sangüínea de prostaglandinas. Quando há um desequilíbrio entre os fatores de defesa e agressão pode desencadear o aparecimento de úlceras. Provavelmente úlceras duodenais estejam mais associadas com a hipercloridria e as gástricas a supressão de fatores defensivos (PACHECO *et al.*, 2006).

Alguns medicamentos, como os antiinflamatórios não-esteróides, quando usados regularmente inibem a via das enzimas ciclo-oxigenases, responsáveis pela síntese das prostaglandinas e desencadeiam o processo ulceroso. As prostaglandinas têm efeito citoprotetor da mucosa por inibir a secreção ácida, aumentar a quantidade de muco e por ser uma substância vasodilatadora que garante o aporte nutritivo necessário para o bom funcionamento celular (WALLACE, 2001; VINAGRE, 2005).

No mundo contemporâneo hábitos alimentares inadequados estão comumente vinculados ao tipo de vida levado pelo homem dessa época. A falta de informação acerca da escolha nutricional do alimento, o hábito de comer compulsivamente, o descomprometimento com os horários das refeições e o estresse surgem como potenciais agentes causais de problemas gástricos que perturbam a população mundial, bem como a brasileira (MATTOS, 2002).

Atualmente, políticas públicas de saúde visam estabelecer e conscientizar a população que a melhor conduta é a prevenção de múltiplas doenças que atingem o trato gastrointestinal (ZIMMER, *et al.*, 2007).

1.2 TERAPIA MEDICAMENTOSA

Dentre os medicamentos utilizados no combate e controle de úlceras pépticas destacam-se os inibidores da bomba de prótons e como adjuvantes no tratamento tem-se os antibióticos que possuem a finalidade de erradicar o Hp. Outro grupo de substâncias citoprotetoras são os antagonistas de receptores H₂ que costumam agir no processo de controle da secreção ácida estomacal.

1.2.1 Antibióticos

O consenso de Maastricht (União Européia) orienta a erradicação do Hp na úlcera péptica (ativa ou cicatrizada), linfoma MALT, gastrites graves e no acompanhamento após ressecção de câncer gástrico precoce (FLEURY, 2006).

Estudos comprovam que a erradicação do Hp reduz drasticamente a recorrência de úlceras duodenais e gástricas. Os esquemas terapêuticos propostos até o momento demonstram alguns inconvenientes, principalmente no que concernem os efeitos adversos e o custo do tratamento, fatores que vem contribuindo contrariamente a adesão ao tratamento (EISIG *et al.*, 2003).

Segundo Gonzaga *et al.* (2000), existem vários antibióticos e suas associações já utilizados para erradicação do Hp em diversos tempos de tratamento. Entretanto, é necessário para alcançar o êxito, a inclusão de um fármaco atuante na secreção salivar e/ou gástrica, como o metronidazol e a claritromicina, concomitante a fármacos de ação luminal a exemplo do bismuto, amoxicilina, tetraciclina e furazolidona.

Determinar qual o melhor tratamento torna-se complexo tanto por esse microrganismo colonizar um ambiente de difícil acesso a muitos medicamentos, quanto pelo surgimento da resistência bacteriana (FREDERICK e RICHARD, 2002). A Tabela 1 demonstra a porcentagem de resistência do Hp frente a claritromicina e do metronidazol.

Tabela 1 – Índices de resistência do Hp frente aos antibióticos metronidazol e claritromicina em diferentes localidades

Localidade	Índice de resistência (%)	
	Claritromicina	Metronidazol
Europa	10,0	33,0
Espanha	3,5	19,9
Portugal	1,5	11,8
França	15,8	46,4
Alemanha	2,0	21,0
Bulgaria	11,4	30,4
Malasia	0,0	10,8
Alaska	26,3	79,3
Peru	50,0	61,0
Brasil	8,0	52,0

Fonte: <<http://www.helicobacterspain.com/trata/resistm.htm>>

Na Europa, a resistência primária aos imidazóis (metronidazol/tinidazol), na década de 90 era de 10 a 50%, enquanto que aos macrolídeos (claritromicina) se situava entre 0 e 15%. No Brasil, em estudos de meta-análise de três inquéritos com 447 pacientes sobre a resistência do Hp, foi observada uma prevalência de 14,3% de linhagens resistentes à claritromicina e de 50% ao metronidazol (GUERREIRO, 2002).

Apesar de múltiplos esquemas terapêuticos terem sido clinicamente testados nos últimos anos, ainda não surgiu o tratamento ideal para erradicação do Hp. Os regimes em que se utilizam só dois fármacos (sendo um inibidor de bomba de prótons e um antimicrobiano) não atingem 100% de erradicação, por isso utiliza-se a associação de três fármacos, o qual em múltiplos ensaios clínicos europeus mostrou-se eficaz em mais de 90% dos casos. Dos três fármacos, um é obrigatoriamente inibidor de bomba de prótons (IBP) ou um antagonista dos receptores H₂ da histamina, sendo os IBP's utilizados com maior frequência. Atualmente, três esquemas terapêuticos estão disponíveis para erradicação do Hp (EGAN, *et al.*, 2007).

A Tabela 2 apresenta três protocolos terapêuticos comumente utilizados no tratamento. O protocolo 1 é aconselhável quando se suspeita de resistência ao metronidazol e o 3 quando a resistência é à claritromicina.

Tabela 2 – Protocolos terapêuticos para o combate ao Hp

Protocolo	Fármacos	Posologia	Tempo de tratamento
1	Omeprazol 20 mg Amoxicilina 1000 mg Claritromicina 5000 mg	2x dia	7 dias
2	Omeprazol 20 mg Metronidazol 400 mg ou Tinidazol 500 mg Claritromicina 250 mg	2xdia	7 dias
3	Omeprazol 20 mg Furazolidona 200 mg Azitromicina 500 mg	1xdia 3xdia 1xdia	7dias 7dias 3dias

Fonte: <www.fbg.org.br>

Na terapêutica quádrupla propõe-se a adição de um IBP, dois antibióticos e um sal de bismuto da ranitidina (antagonista dos receptores H₂ da histidina). Este tratamento tem-se mostrado eficaz em 95-100% dos casos em que havia resistência primária ao metronidazol (EGAN, 2007).

Após o término do tratamento deve-se realizar o controle de cura após um a três meses para evitar resultados falso-negativos. O exame diagnóstico de escolha é o respiratório, porém pode-se também realizar o teste de urease e/ou histológico. A sorologia não é segura para a confirmação da erradicação, por que os valores de anticorpos podem permanecer elevados por um período prolongado (GUIDELINES e PROTOCOLS, 2002).

Atualmente, existe uma demanda por pesquisas que busquem diferentes substâncias com propriedades similares aos antibióticos e que possuam reduzido efeito adverso e baixo custo (KUBO, J *et al.*, 1999). A Tabela 3 apresenta compostos que vem sendo obtidos a partir de plantas e demonstraram possíveis fontes alternativas de terapia (CASTILLO-JUAREZ *et al.*, 2007).

Tabela 3 – Produtos naturais com comprovada ação anti- Hp

Substância	Composto ativo	Referência
Extrato acetanólico e etanólico do alho	Alicina	Canizares <i>et al.</i> , 2004
Extrato hidroalcoólico do pseudofruto do caju	Ácidos anacárdicos	Kubo, J <i>et al.</i> , 1999
Extrato metanólico do Sândalo	β -santalol α -santalol	Ochi, 2005
Extrato metanólico de <i>Dracaena cochinchinensis</i>	Flavonóides	Zhu, 2007
Curcuma Amada	Frações fenólicas	Siddaraju e Dharmesh, 2007
Azeite vegetal virgem	Frações fenólicas	Romero <i>et al.</i> , 2007
Extrato etanólico de <i>Amphipterygium adstringens</i>	Ácidos anacárdicos	Castillo-Juárez <i>et al.</i> , 2007.
Extrato clorofórmico de <i>Cistus laurifolius</i>	Flavonóides	Ustun <i>et a.</i> , 2006

Fonte: Pesquisa própria.

1.2.2 Citoprotetores

Os medicamentos inibidores de bomba de prótons (IBP) têm sido largamente utilizados por atuarem como inibidor do sangramento gástrico, como coadjuvantes na erradicação do Hp, bem como na profilaxia de reincidivas do episódio ulceroso (LOURENÇO e OLIVEIRA, 2003).

Quando instalado o processo ulceroso na mucosa gástrica, o sangramento desencadeado torna-se de difícil controle, pois o meio ácido desse ambiente dificulta a agregação plaquetária. Os IBP agem diminuindo a secreção gástrica, com intuito de facilitar a agregação plaquetária (GIORDANO-MAPPI e MALUF FILHO, 2008).

Os IBP são os mais potentes supressores ácidos do estômago. Foram demonstrados os seus benefícios no tratamento das úlceras pépticas hemorrágicas em estudo realizado com 220 pacientes que faziam uso de omeprazol por via oral (40 mg) duas vezes por dia ou placebo por cinco dias após o diagnóstico endoscópico. Os pacientes tratados com IBP e portadores de úlceras com vaso visível sem sangramento ou coágulo aderido em sua base tiveram menor probabilidade de sangramento. O mesmo não ocorreu nos pacientes com sangramento ativo ou em porejamento. Em úlceras onde o sangramento cessou espontaneamente, a supressão ácida evitou a recorrência de sangramentos (SUNG, 2006).

Em estudo realizado por Lau *et al.* (2000), 240 pacientes com hemorragia ulcerosa ativa ou com vaso visível sem sangramento ativo que foram submetidos ao exame endoscópico e utilizaram omeprazol (80 mg endovenoso seguido de 8 mg por hora por 72h) ou placebo, a taxa de recorrência de sangramento até 30 dias foi de 5,8% para o grupo omeprazol e 21,7% para o grupo placebo.

Os antagonistas aos receptores da Histamina 2 das células parietais atuam por antagonismo competitivo seletivo e são potentes inibidores da secreção do ácido clorídrico, não afetando, portanto a secreção de fatores intrínsecos ou a mobilidade gástrica. Vários bloqueadores são comercializados (cimetidina, ranitidina e famotidina) e podem apresentar resultados de cicatrização entre 80% a 90% em um intervalo de quatro semanas (ROCHA *et al.*, 2006).

Com a intensificação pela procura de substâncias naturais que ajam como gastroprotetores, experimentos com modelos animais comprovaram que os extratos e princípios ativos de diversas plantas como *Rosmarinus officinalis* (alecrim), *Artemisia annua*, *Maytenus ilicifolia* (espinheira-santa), *Luehea divaricata* (açoita cavalo), entre outras, exerceram efeito antiulcerogênico por inibição da secreção de ácido clorídrico (CARVALHO, 2006).

1.3 PRODUTOS NATURAIS

As pesquisas envolvendo plantas medicinais são complexas e apresentam um caráter multidisciplinar, principalmente quando objetiva encontrar substâncias ativas úteis na terapêutica. Nessas pesquisas, a experiência indica que a seleção da espécie a ser estudada deve levar em consideração a indicação popular de uso medicinal em conjunto com uma equipe que tenha experiência na identificação de espécies botânicas, no isolamento e determinação das substâncias ativas e na escolha e execução dos ensaios farmacológicos (FERREIRA, 2005).

Dentre as espécies de utilização na medicina popular contra agravos estomacais e infecções bacterianas a mangaba e o caju se destacam por serem utilizadas e facilmente encontradas na região nordeste do Brasil, sendo a própolis vermelha ainda pouco utilizada pela população por ser encontrada predominantemente em algumas regiões do nordeste e ser pouco estudada (KUBO, J *et al.*, 1999; PASSOS, 2007).

1.3.1 Mangaba

A mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) trata-se de uma árvore frutífera nativa do Brasil e largamente encontrada em vários estados brasileiros, com grande dispersão natural na região nordeste, em especial no Estado de Sergipe. O fruto, principal produto consumido, é utilizado na alimentação humana, principalmente na forma de suco e sorvete, podendo também ser consumido *in natura* (SANTOS *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2007).

O látex da mangabeira e o suco leitoso do fruto são utilizados popularmente para tratamento de doenças fúngicas, contra tuberculose e úlceras gástricas (GUARIM NETO e MORAIS, 2003; SAMPAIO e NOGUEIRA, 2005; SANTOS *et al.*, 2007). Moraes *et al.* (2008) avaliaram a ação anti Hp e o efeito gastroprotetor do extrato da casca do caule da mangabeira. Os resultados demonstraram que este extrato possui efetividade no combate e cicatrização de úlceras gástricas por sua capacidade de estimular a síntese de muco e produzir efeito anti-secretório. Os autores observaram também efeito anti-Hp e ausência de toxicidade (MORAES *et al.*, 2008).

Segundo Xu *et al.* (2007), a proteção da mucosa gástrica contra ataques por agentes necrosantes se dá principalmente pela produção de muco. Ainda foi observado que as proantocianinas participam na aceleração do reparo da mucosa quando a lesão é produzida por ácido acético. Os compostos fenólicos presentes no extrato da mangabeira possuem molécula com o grupo catecol que apresentam atividade antioxidante, as quais estão ligadas diretamente ao processo de citoproteção.

Apesar da utilização na medicina popular para diversos fins, os frutos e o látex da mangabeira ainda necessitam de estudos mais detalhados acerca da sua composição química, atividade gastroprotetora, analgésica e antimicrobiana (BOMFIM, 2001; CRUZ, 2002).

1.3.2 Caju

A cultura do caju é de grande importância sócio-econômica para a região nordeste do Brasil. A amêndoa é muito apreciada, constituindo, juntamente com o líquido da castanha de caju, o principal produto de exportação. O pedúnculo de aparência exótica apresenta alto teor de vitamina C e grande valor nutricional, entretanto, o aproveitamento é insignificante em relação à quantidade de matéria prima potencialmente disponível (AGOSTINI-COSTA *et al.*, 2004).

O extrato da casca do caule de *Anacardium occidentale* L. (cajueiro), possui atividade antimicrobiana em diferentes organismos como *Morganella morganii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella typhi* (LAURENS *et al.*, 1992). A casca tem efeito adstringente, por ser rica em tanino, sendo usada em curtume, além de ter capacidade tintorial vermelho-escuro (tinge roupas, redes em linhas de pesca). A resina obtida por cortes no tronco apresenta ação expectorante e é usada no preparo de bebidas, como a cajuína e a jeropinga (AKINPELU, 2001).

Os principais compostos bioativos presentes no caju são os ácidos anacárdicos, entretanto, nos pedúnculos de caju, a proporção desses compostos fenólicos é muito baixa (SHOBA *et al.*, 1994). Os ácidos anacárdicos são biosintetizados a partir de ácidos graxos. Constituem cerca de 90% do líquido que é extraído da casca da castanha do caju, sendo que, em tais concentrações, apresentam propriedades cáusticas e irritantes (DIÓGENES *et al.*, 1996).

Estudos com suco de caju comercializado demonstraram o potencial antitumor dos ácidos anacárdicos, sugerindo que o consumo contínuo do pedúnculo, assim como seus

subprodutos, durante períodos prolongados pode ser vantajoso no controle de tumores. A avaliação da atividade antimicrobiana do extrato etanólico do pedúnculo de caju frente à *Helicobacter pylori*, demonstrou na fração etil-acetato efetividade (KUBO, I *et al.*, 1993; KUBO, J *et al.*, 1999).

1.3.3 Própolis vermelha

Na medicina popular, a própolis tem sido usada de forma empírica, desde os tempos antigos, como agente antimicrobiano, antiinflamatório, cicatrizante, anestésico, antioxidante e até mesmo anti-cancerígeno. Essas propriedades abrem a possibilidade de sua aplicação nas indústrias farmacêutica e alimentícia, na forma de alimentos funcionais. Atualmente, 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, creme dental, pastilhas, balas, chocolates, gomas de mascar, doces, entre outros (PARK *et. al.*, 1998; MANARA *et. al.*, 1999; VARGAS *et. al.*, 2004).

A composição química da própolis é extremamente complexa e mais de 180 compostos foram identificados, destacando-se como de grande importância os flavonóides. Estes compostos fenólicos compreendem um amplo grupo de substâncias naturais não sintetizadas pelos animais (DAUGSCH *et al.*, 2007). Cerca de 4.000 substâncias diferentes já foram listadas como flavonóides, elasapigenina, quercetina, hesperetina, rutina, luteolina, genisteina, daidzeina, antocianidina e canferol. A presença e a concentração destes compostos são utilizadas como índice de qualificação de amostras de própolis (AWALE *et al.*, 2008).

Os flavonóides, juntamente com ácidos fenólicos e ésteres, aldeídos fenólicos e cetonas são considerados os mais importantes compostos antimicrobianos da própolis. Outros compostos são óleos voláteis e ácidos aromáticos (5 a 10%), ceras (30-40%), resinas, bálsamo e pólen que é uma rica fonte de elementos essenciais como magnésio, níquel, cálcio, ferro e zinco (ALENCAR *et al.*, 2007). O mecanismo de atividade antibacteriana é considerado complexo e pode ser atribuído ao sinergismo entre flavonóides, hidroxiácidos e terpenos (FERNANDES JÚNIOR *et al.*, 2006).

A proporção destas substâncias presentes na própolis é variável em função do local e da época de coleta da mesma (FERNANDES JÚNIOR *et al.*, 2006). Portanto, a origem

geográfica da própolis é importante no controle de qualidade inclusive para sua efetiva aplicação terapêutica (PARK *et al.*, 2002).

Certamente a capacidade de inibir o crescimento de microrganismos desta resina é uma das atividades farmacológicas mais popularmente conhecidas e comprovadas cientificamente (SALOMÃO *et al.*, 2007). Diversos pesquisadores têm demonstrado tal atividade frente a microrganismo como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, entre outras (PARK *et al.*, 1998). Ensaio *in vitro* utilizando 10 espécies bacterianas Gram-positivas e 20 Gram-negativas, constataram que a atividade antibacteriana da própolis demonstra ser mais eficaz dentre as Gram-positivas (SFORCIN *et al.*, 2000; FERNANDES JÚNIOR *et al.*, 2006; SALOMÃO *et al.*, 2007; ARAÚJO, 2009).

Alguns trabalhos evidenciaram a capacidade da própolis de inibir o crescimento de *Helicobacter pylori* sendo este produto um potencial inibidor de úlceras gástricas (OHSUGI *et al.*, 1997; HASHIMOTO *et al.*, 1998; BANSKOTA *et al.*, 2001; BOYANOVA *et al.*, 2005; MENEZES, 2005).

Em relação à variedade de própolis vermelha existem poucos estudos, sendo que estes trazem informações sobre o potencial biológico desta, além da descrição dos constituintes bioativos, composição química e origem botânica (ALENCAR *et al.*, 2007; DAUGSCH *et al.*, 2007; SALOMÃO *et al.*, 2007).

REFERÊNCIAS

- AGOSTINI- COSTA, T. S.; JALES, K. A.; GARRUTI, D. S.; PADILHA, V. A.; LIMA, J. B.; AGUIAR, M. J.; PAIVA, J. R. Teores de ácido anacárdico em pedúnculos de cajueiro *Anacardium microcarpum* e em oito clones de *Anacardium occidentale* var. *nanum* disponíveis no nordeste do Brasil. **Ciência Rural**. v. 34, n. 04, jul/ago, 2004.
- AKINPELU, D. A. Antimicrobial activity of *Anacardium occidentale* Linn. Bark. **Fitoterapia** 72: 287-289, 2001.
- ALENCAR, S.M.; OLDONI, T.L.C.; CASTRO, M.L.; CABRAL, I.S.R.; COSTA-NETO, C.M.; CURY, J.A.; ROSALEN, P.L.; IKEGAKID, M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. **Journal of Ethnopharmacology** doi: 10.1016/j.jep. 2007.
- AMIEVA, M. R.; EL-OMAR E. M. *Host-Bacterial Interactions in Helicobacter pylori Infection*. **Gastroenterology**. 134:306–323, 2008.
- ANDREOLI, T.E. Free radicals and oxidative stress. **Am. J. Med**. v. 108, p. 650-651, 2000.
- ARAUJO, Y.L.F.M. **Estudo da atividade antimicrobiana de variedades de própolis da região da Foz do Rio São Francisco-Brasil**. Dissertação de mestrado, UNIT, Aracaju-SE. 2009.
- AWALE, S.; LI, F.; ONOZUKA, H.; ESUMI, H.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S. Constituents of Brazilian red propolis and their preferential cytotoxic activity against human pancreatic PANC-1 cancer cell line in nutrient-deprived condition. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. 16 181-189, 2008.
- BANSKOTA, A.H.; TEZUKA, Y.; ADNYANA, I.K. Hepatoprotective and anti-Helicobacter pylori activities of constituents from Brazilian propolis. **Phytomedicine**. v. 8, p.16-23, 2001.
- BARROS, M.P.; LEMOS, M.; MAISTRO, E. L.; LEITE, M. F.; SOUSA, J. P. B.; BASTOS, J. K.; ANDRADE, S. F. Evaluation of antiulcer activity of the main phenolic acids found in Brazilian Green Propolis. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 120, p. 372–377, 2008.
- BATISTA, L. M. **Atividade Antiulcerogênica de Extratos e Frações obtidas dos escapos das espécies *Syngonanthus bisulcatus* Rul. e *Syngonanthus arthrotrichus* Silveira em modelos animais**. Tese de doutorado, UNICAMP. Campinas-SP, 2003.
- BOMFIM, K.B.R. **Farmacologia de plantas medicinais analgésicas de uso popular da caatinga**: Poço Redondo, Sergipe. *Dissertação de mestrado*, UFS, Sergipe, 2001.
- BONAMIGO, R.R.; LEITE C.S.M.; BAKOS L. Estudo sobre a associação entre *Helicobacter pylori* e urticária crônica idiopática. **Rev Ass Med Brasil**. 45(1): 9-14, 1999.
- BOYANOVA, L.; GERGOVA, G.; NIKOLOV, R.; DEREJIAN, S.; LAZAROVA, E.; KATSAROV, N.; MITOV, I.; KRASSTEV, Z. Activity of Bulgarian propolis against 94 *Helicobacter pylori* strains in vitro by agar-well diffusion, agar dilution and disc diffusion methods. **Journal of Medical Microbiology**. v. 54, n. 5, p.481-483, 2005.
- BRUNTON, L.L. Agents for control of gastric acidity and treatment of peptic ulcers. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; MOLINOFF, P. B.; RUDDON, R. W.; GILMAN A. G.

Goodman e Gilman's. **The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 9th edition. New York: McGraw-Hill, p. 663-691, 1996.

CALAM, J.; BARON, J. H. Pathophysiology of duodenal and gastric ulcer and gastric cancer. **BMJ**. 323; 980-2, 2001.

CANIZARES, P.; GRACIA, I.; GOMEZ, L. A.; ARGILA, C. M.; BOIXEDA, D.; GARCIA, A.; RAFAEL, L. Allyl-thiosulfinates, the Bacteriostatic Compounds of Garlic against *Helicobacter pylori*. **Biotechnol Prog**. v. 20. n. 1. 2004.

CARVALHO, J. E. Atividade Antiulcerogênica e Anticâncer de Produtos Naturais e de Síntese. **Multiciência**: construindo a história dos produtos naturais, v. 07, 2006.

CASTILLO-JUAREZ, I.; RIVERO-CRUZ, F.; CELIS, H.; ROMERO, I. Anti-*Helicobacter pylori* activity of anacardic acids from *Amphipterygium adstringens*. **Journal of Ethnopharmacology**. 114 72–77, 2007.

CAVATAIO, F.; IACONO, G.; MONTALTO, G.; SORENSI, M.; TUMINELLO, M.; CAMPAGNA, P. Gastroesophageal reflux associated with cow's milk allergy in infants: which diagnostic examinations are useful? **Am J Gastroenterol**. v. 91, p.1215-1220, 1996.

CRUZ, M.C.S. **Avaliação da atividade antifúngica de plantas utilizadas popularmente pela comunidade de Curitiba, município de Canindé de São Francisco-SE**. Dissertação de mestrado - UFS, Sergipe, 2002.

DAUGSCH, A.; MORAES, C.S.; FORT, P.; PARK, Y.K. Brazilian Red Propolis - Chemical Composition and Botanical Origin. **eCAM Advance Access published**. July 7, p.1, 2007.

DIOGENES, M.J.N.; MORAIS, S.M.; CARVALHO, F.F. Contact dermatitis among cashew nut workers. **Contact Dermatitis**. v. 35, p.114-115, 1996.

EATON, K.A.; SUERBAUM, S.; JOSENHANS, C.; KRAKOWKA, S. **Colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori* deficient in two flagellin genes**. *Infect Immun*. 64: 2445-8, 1996.

EGAN, B. J.; O'CONNOR H. J.; O'MORAIN, C. A. Treatment of *Helicobacter pylori*. **Blackwell Publishing Ltd**. *Helicobacter* (Suppl.1): 31–37, 2007.

EISIG, J. N.; ANDRÉ, S. B.; SILVA, F. M.; HASHIMOTO, C.; MORAIS- FILHO, J. P. P.; LAUDANNA, A. A. The impact of *Helicobacter pylori* resistance on the efficacy of a short course pantoprazole based triple therapy. **Arq Gastroenterol**. v. 40. n. 1. jan./mar. 2003.

FERNANDES JÚNIOR, A.; LOPES, M.M.R.; AYDIR, V.C.; MOTEIRO, C.M.; VIEIRA, E.P.; Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis mellifera* obtidas em três regiões do Brasil. **Ciência Rural**. v. 36, n.1, p.294-297. Santa Maria-RS, 2006.

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

FLEURY. *Helicobacter pylori*. Disponível em: <<http://www.fleury.com.br/site/Msf/o/fod07650414c3ab903256d36006c4f2...>>. Acesso em: 24/03/2006.

FREDERICK, J.; RICHARD, A.W. ***Helicobacter pylori*: Review an Update**. Hospital Physican. may, 2002.

GIORDANO- MAPPI, J.; MALUF FILHO, F. Aspectos endoscópicos no manejo da úlcera péptica duodenal. **Rev. Col. Bras. Cir.** v. 35. n. 2, mar/abr. 2008.

GO, M.F.; CROWE, S.E. Virulence and pathogenicity of *Helicobacter pylori*. **Gastroenterol. Clin. N. Amer.** 29: 649-670, 2000.

GONZAGA VAZ COELHO L.; LEÓN-BARÚA R.; QUIGLEY EMM and representatives of the Latin-American National Gastroenterological Societies affiliated with the Inter-American Association of Gastroenterology (AI-GE). Latin-American Consensus Conference on *Helicobacter pylori* infection. **Am J Gastroenterol.** 95: 2688-2691, 2000.

GUARIM NETO, G.; MORAIS, R.G. Recursos medicinais de espécies do cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. **Acta Botânica Brasileira.** v.17. n.4, p.561- 84, 2003.

GUERREIRO, A. S. **Susceptibilidade *in vitro* do *Helicobacter pylori*.** Grupo de estudos Português do HP. mai/jun, 2002.

GUIDELINES & PROTOCOLS. **Protocol for detection and treatment of *Helicobacter Pylori* infection in adults.** january 1, 2002.

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

HASHIMOTO, T.; AGA, H.; T ABUCHI, A. Anti-*Helicobacter pylori* compounds in Brazilian propolis. **Nature Medicine.** v. 52, p. 518-520, 1998.

HIRSCHOWITZ, B. I.; KEELING, D.; LEWIN, M.; OKABE, S.; PARSONS, M.; SEWING, K.; WALLMARK, B.; SACHS, G. Pharmacological aspects of acid secretion. **Dig. Dis. Sci.** 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.

KUBO, I.; LEE, J. R.; KUBO, J. Antitumor agents from the cashew (*Anacardium occidentale*) apple juice. **Journal of Agriculture and Food Chemistry.** v. 4, p.1012-1015, 1993.

KUBO, J.; LEE, J. R.; KUBO, I. Anti-*Helicobacter pylori* Agents from the Cashew Apple. **J. Agric. Food Chem.** 47, 533-537, 1999.

LADEIRA, M.S.P.; SALVADORI, D. M. F.; RODRIGUES, M.A.M. Biopatologia do *Helicobacter pylori*. **JBPCIML.** v. 39, Rio de Janeiro, 2003.

LAU JY.; SUNG JJ.; LEE KK.; YUNG MY.; WONG SK WU JC.; CHAN FK.; NG EK.; YOU JH.; LEE CW.; CHAN AC.; CHUNG SC. Effect of intravenous omeprazole on recurrent bleeding after endoscopic treatment of bleeding peptic ulcers. **N Engl J Med.** 343(5):310-6, 2000.

LAURENS, A.; MBOUP, S.; GIONO, A.; BARBER, P.; DAVID-PRINCE, M. **Étude de l'action antibatérienne d'extraits d'*Anacardium occidentale* L.** **Ann Pharm Fr** 40: 143-146,1992.

LINZ, B.; SCHUSTER, S.C. Genomic diversity in *Helicobacter* and related organisms. **Research in Microbiology.** 158 737e744, 2007.

LIU, C.F.; LIN, C.C.; LIN, M.H.; LIN, Y.; LIN, S.C. Cytoprotection by Propolis Ethanol Extract of Acute Absolute Ethanol-Induced Gastric Mucosal Lesions. **The American Journal of Chinese Medicine.** v. 30, 245–254, 2002.

- LOURENÇO, K. G.; OLIVEIRA, R. B. **Abordagem do paciente com hemorragia digestiva alta não varicosa.** *Medicina*. Ribeirão Preto-SP. 36:261-5, 2003.
- MANARA, L. R. B.; GROMATZKY, A.; CONDE, M. C.; BRETZ, W. A. Utilização da própolis em odontologia. **Rev. FOB**. v. 7, n. 3/4, p. 15-20, 1999.
- MARQUES, S. C. Compreender a dispepsia. **Rev Port Clin Geral**. 18:227-39, 2002.
- MARTINS, L.C.; CORVELO, T.C.O.; OTI, H.T.; BARILE, K.A.S. Soroprevalência de anticorpos contra o antígeno CagA do *Helicobacter pylori* em pacientes com úlcera gástrica na região Norte do Brasil. *Revista Socied. Brasil. Méd. Tropical*. 35 (4): 307-310, 2002.
- MATTOS, L. A. J. Hábitos alimentares. **Revista prática hospitalar**. Rio de Janeiro, n. 19, p. 61-62, 2002.
- MELO-JÚNIOR, M. R.; MACHADO, M. C. F. P.; ARAUJO-FILHO, J. L. S. Avaliação histoquímica da mucosa gastrointestinal de ratos expostos ao álcool. **Rev. Para. Med.** dez. v. 20, n. 4, p.7-12. 2006.
- MENEZES, H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Arq. Inst. Biol.** São Paulo, v. 72, n. 3, p. 405-411, jul/set, 2005.
- MOORE, R.A.; DPHIL, M.A. ***Helicobacter pylori and Peptic Ulcer. A systematic review of effectiveness and overview of the economic benefits of implementing.*** What is Known to be Effective. Oxford, 1994.
- MORAES T. M.; RODRIGUES C.M.; KUSHIMA, H.; BAUABC T. M.; VILLEGASB, W.; PELLIZZON C.H.; BRITO A.R.M.S.; HIRUMA-LIMA C.A., ***Hancornia speciosa***: Indications of gastroprotective, healing and anti-*Helicobacter pylori* actions *Journal of Ethnopharmacology*. 120, 161–168, 2008.
- MORAN, A.P. The role of lipopolysaccharide in *Helicobacter pylori* pathogenesis. **Aliment. Pharmacol.** 1: 39-50, 1996.
- NOGUEIRA P. C. L.; SAMPAIO T. S. **Volatile components of mangaba fruit (*Hancornia speciosa* Gomes) at three stages of maturity**, *Food Chemistry*, 2006.
- NOSTRO A.; CELLINI L.; DI BARTOLOMEO; CANNATELLI, N.A.; DI CAMPLI, E.D.; PROCOPIO, F. S.; GRANDE, R.; MARZIO, L.; ALONZO, V. **Effects of Combining Extracts (from Propolis or *Zingiber officinale*) with Clarithromycin on *Helicobacter pylori*.** *Phytother. Res.* 20, 187–190, 2006.
- OCHI, T.; SHIBATA, H.; HIGUTI, T.; KODAMA, K.; KUSUMI, T.; TAKAISHI, Y. **Anti-*Helicobacter pylori* Compounds from *Santalum album*.** **Journal of Natural Products**. v. 68. n. 6, 2005.
- OHSUGI, M.; BASNET, P.; KADOTA, S. Antibacterial activity of traditional medicines and an active constituent lupulone from *Humulus lupulus* against *Helicobacter pylori*. **Journal of Traditional Medicines**. v.14, p.186-191, 1997.
- PACHECO, M. T. B.; BIGHETTI, E.; ANTÔNIO M.; CARVALHO, J.E.; ROSANELI, C.F. GARBIERI V. C. Efeito de um hidrolisado de proteínas de soro de leite e de seus peptídeos na proteção de lesões ulcerativas da mucosa gástrica de ratos. **Rev. Nutr.** v.19, n.1, p. 47-55., 2006.

PAGANA, K.D.; PAGANA, T.J. **Manual de Testes Diagnósticos e Laboratório**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

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-SP. v. 18, n. 3, ago/oct. 1998.

_____; ALENCAR, S.M.; AGUIAR, C.L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **J Agric Food Chem**. 50:2502–6, 2002.

PASSOS, M. C. F. Infecção pelo *Helicobacter pylori*: prevalência e associação com lesões gástricas. **Arq Gastroenterol**. v. 44. n. 2. abr/jun, 2007.

RAZALI, N.; Razab, R.; ZUNIT, S.M.; AZIZ, A.A. **Radical scavenging and reducing properties of extracts of cashew shoots (*Anacardium occidentale*)**. Elsevier, 111, 38-44, 2008.

REKTORSCHKE, M.; WEEKS, D.; SACHS, G.; MELCHERS, K. Influence of pH on metabolism and urease activity of *Helicobacter pylori*. **Gastroenterology**. 115: 628-641, 1998.

ROCHA, G. R.; STEIN, R.; GUIMARÃES, M.R.; RIBEIRO, J. P. Resposta cronotrópica ao teste cardiopulmonar após o uso de cimetidina. **Arq. bras. cardiol**. 86(3):206-210, 2006.

SALOMÃO, K.; PEREIRA, P. R. S.; CAMPOS, L. C.; BORBA C. M.; CABELLO, P. H.; MARCUCCI, M. C.; CASTRO, S. L. Brazilian Propolis: Correlation Between Chemical Composition and Antimicrobial Activity. **Oxford Journals**. eCAM Advance Access published online on June 11, 2007.

SAMPAIO, T.S.; NOGUEIRA, P.C.L. Volatile components of mangaba fruit (*Hancornia speciosa*) at three stages of maturity. **Food Chemistry**. v. 95. p.606-10, 2005.

SANTOS, P.O.; BARBOSA JUNIOR, A.M.; MÉLO, D.L.F.M.; TRINDADE, R.C. Investigação da atividade antimicrobiana do látex da mangabeira (*Hancornia speciosa* GOMES). **Rev. Bras. Pl. Med**. Botucatu-SP. v. 9., n. 2, p.108-111, 2007.

SFORCIN, J.M.; FERNANDES JUNIOR, A.; LOPES C. A. M.; BANKOVA, V.; FUNARI, S. R. C. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. **J Ethnopharmacol**. v. 73. n.1-2, p. 43-249, 2000.

SHIOTANI, A.; GRAHAM D.Y. Pathogenesis of gastric and duodenal ulcer. **Med Clin North Am**. v. 86, p. 1447, 2002.

SHOBHA, S.V.; RAMADOSS, C.S.; RAVINDRANATH, B. Inhibition of soybean lipoxygenase-1 by anacardic acids cardols and cardanols. **Journal of Natural Products**. v. 57, p.1755-1757, 1994.

SINTES, R. A.; CRUZ, F. A.; SINTES, R. A.; CASTRO M. R. A. Epidemiología de la ulcera péptica en siete consultorios del médico de la familia. **Rev Cubana Med Gen Integr**. v.11 n.3 Ciudad de La Habana mayo-jun. 1995.

SIQUEIRA, J. S.; LIMA, P. S.S.; BARRETO, A. S.; QUITANS-JUNIOR, L. J. Aspectos Gerais nas Infecções por *Helicobacter pylori* Revisão. **RBAC**. v. 39(1): 9-13, 2007.

SOUZA, F. G.; FIGUEIREDO, R. W.; ALVES, R. E.; MAIA, G. A.; ARAUJO, I. A. Qualidade pós-colheita de frutos de diferentes clones de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciênc. agrotec**. v. 31 n. 5 Lavras sept./oct. 2007.

SUNG J. **Current management of peptic ulcer bleeding.** *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.* 3(1):24-32, 2006.

USTUN, O.; ELIK, B. O.; AKYON, Y.; ABBASOGLU, U.; YESILADA, E. Flavonoids with anti-*Helicobacter pylori* activity from *Cistus laurifolius* leaves. **Journal of Ethnopharmacology.** 108 457–46, 2006.

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 *Chlorella vulgaris*.** Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção de Título de Mestre em Biologia Funcional e Molecular, na área de Fisiologia. Universidade Estadual de Campinas. São Paulo, 2005.

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

WOLFE, M. M.; SACNHES, G. Acid suppression: optimizing therapy for gastroduodenal ulcer healing, gastroesophageal reflux disease and stress-related erosive syndrome. **Gastroenterology.** 118:s9-s31, 2000.

XU, X.; XIE, B.; PAN, S.; LIU, L.; WANG, Y.; CHEN, C., Effects of sea buckthorn procyanidins on healing of acetic acid-induced lesions in the rat stomach. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition.** 16, 234–238. 2007.

ZIMMER, A.F.; SEITZ, D. R.; MACCARI, I. M.; JELLINEK, M. J.; MALAGUTTI, M.; SCHMOLLER, S.; OLIVEIRA, D. Influência dos hábitos alimentares no desenvolvimento de gastrites estomacais. **Biology & Health Journal.** v. 1, n. 1, 2. 2007.

CAPÍTULO 2

ATIVIDADE GASTROPROTETORA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE PRÓPOLIS VERMELHA

Resumo

A úlcera gástrica é um importante agravo à saúde pública, acometendo cerca de 10% da população mundial. Fatores de risco como etilismo, tabagismo, estresse, hábitos alimentares, uso de medicamentos, entre outros, associados ou não a infecção por *Helicobacter pylori*, podem desencadear lesões ulcerosas. A pesquisa por produtos naturais que possuam ação antimicrobiana e/ou gastroprotetora torna-se importante, posto que pode auxiliar no tratamento dessa doença. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade gastroprotetora e antioxidante do extrato hidroetanólico da própolis vermelha, variedade ainda pouco estudada e presente na região nordeste do Brasil. O extrato foi obtido por maceração utilizando etanol 70% como solvente e o teor de flavonóides e atividade antioxidante foram determinadas. Ensaio *in vitro* para determinação da atividade antimicrobiana frente ao *Helicobacter pylori* e *in vivo* para avaliação da gastroproteção do extrato foram realizados. A atividade antimicrobiana foi avaliada utilizando o método de difusão em poços. A gastroproteção foi determinada após exposição do animal ao extrato seguido de produção da lesão utilizando álcool etílico. Após uma hora os animais foram sacrificados e foi realizada a avaliação macroscópica e histopatológica do estômago. O resultado obtido acerca do teor de flavonóides foi de 0,31%. Quanto ao potencial antioxidante obteve-se IC₅₀ de 0,294 mg/mL e referente a atividade antimicrobiana do extrato em estudo, foi observado que nas condições desse experimento, a própolis vermelha demonstrou um halo médio de inibição de 13±2 mm. O índice de inibição de lesões ulcerativas foi calculado utilizando duas metodologias. Para a avaliação segundo Gamberini *et al.* (1991), o extrato de própolis vermelha apresentou inibição das lesões de 92,3%. Na metodologia adotada por Szelenyi e Thiemer (1979) foi encontrado 100% de inibição e índices de lesão ulcerativa (ILU) de 0,5±0,6 e 0,0±0,00 respectivamente para as metodologias citadas. Portanto, pôde-se evidenciar que a própolis vermelha apresentou uma importante atividade gastroprotetora que pode ser relacionada a atividade antimicrobiana e antioxidante da amostra estudada.

Palavras-chave: Úlcera péptica; própolis vermelha; *Helicobacter pylori*; gastroproteção.

Abstract

The gastric ulcer is a major public health disorder affecting approximately 10% of world population. Risk factors such as alcoholism, smoking, stress, eating habits, medication use, among others, associated or not with *Helicobacter pylori* infection, can cause ulcerative lesions. The search for natural products that have antimicrobial action and / or gastric protector becomes important, since it may help in treating this disease. The objective of this study was to evaluate the antioxidant and gastric protector potential of the hydro alcoholic extract of red propolis, variety still little studied and found in the northeastern region of Brazil. The extract was obtained by maceration using 70% ethanol as solvent and content of flavonoids and antioxidant activity were determined. Antimicrobial activity was evaluated using the method of diffusion in wells. Gastric protection was determined after exposure of the animal to extract followed by production of the lesion using alcohol. After one hour the animals were sacrificed and macroscopic assessment and histopathology of the stomach was performed. The result obtained on the content of flavonoids was 0.31%. As for the antioxidant potential it was obtained IC₅₀ of 0294 mg / mL and for antimicrobial activity of the extract under study, it was observed that on the conditions of this experiment, the red propolis showed an average halo of inhibition of 13 ± 2 mm. The rate of inhibition of ulcerative lesions was calculated using two methodologies. For evaluation by Gamberini et al. (1991), the extract of red propolis showed inhibition of 92.3% of injuries. In the methodology adopted by Szelenyi and Thiemer (1979) it was found 100% of inhibition and rate of ulcerative lesion (ILU) of 0.5 ± 0.6 and 0.0 ± 0.00 respectively for the mentioned methods. So, it was evident that the red propolis showed an important gastric protector activity that may be related to antioxidant and antimicrobial activity of the sample studied.

Key-words: Peptic ulcer, red propolis, *Helicobacter pylori*, gastric protection.

2.1 INTRODUÇÃO

A úlcera péptica é uma lesão que ocorre na mucosa gástrica e duodenal. Sua incidência é mundial com grande prevalência em países desenvolvidos. A lesão é iniciada a partir de um desequilíbrio entre fatores fisiológicos de defesa, tais como, a proteção mucóide e a secreção de prostaglandina, bicarbonato e pepsina ácida e fatores agressores como estresse, tabagismo, etilismo, uso de anti-inflamatórios não esteroidais, hábitos alimentares inadequados, infecção por *Helicobacter pylori* (Hp) e predisposição genética. Os fatores agressores agem conjuntamente reduzindo a defesa da mucosa gástrica e ocasionando a lesão (WOLFE e SANCHES, 2000; WALLACE, 2001; JAINU e DEVI, 2006; LIMA *et al.*, 2006).

O tratamento convencional da úlcera gástrica baseia-se na inibição da secreção estomacal por medicamentos como os antagonistas aos receptores da histamina (receptores H₂) das células parietais e os inibidores de bomba de prótons (LOURENÇO e OLIVEIRA, 2003; BIGUHETTI *et al.*, 2005; ROCHA *et al.*, 2006). Porém, um dos principais problemas com relação a essa terapêutica é a taxa de reincidência da úlcera após um ano do término do

tratamento que é de 40 a 80% e as reações adversas causadas por esses fármacos (MILLER e FARAGUER, 1986; CHAN e LEUNG, 2002).

A associação entre a lesão e a infecção por Hp agrava o prognóstico do paciente e aumenta o índice de recorrência da lesão, fazendo-se necessário a erradicação desse microrganismo por antibióticos (CANIZARES *et al.*, 2004). Entretanto, a resistência deste agente frente aos antimicrobianos de escolha é crescente e o curso do seu tratamento desencadeia importantes efeitos adversos que levam o paciente ao abandono do tratamento (OCHI *et al.*, 2005). Desta forma, a busca de novas substâncias que possuam ação anti-ulcerogênica e/ou anti-Hp tem sido objeto de diversas pesquisas (LIU *et al.*, 2002; NOSTRO *et al.*, 2005; BARROS *et al.*, 2008).

A própolis é uma substância resinosa produzida por abelhas a partir de plantas que ganhou popularidade como uma alternativa aos tratamentos de diversas afecções. Atualmente sabe-se que essa possui diversas atividades biológicas importantes no tratamento de agravos à saúde da população como atividade antioxidante, antimicrobiana, antiulcerogênica, antifúngica, anticarcinogênica entre outras (BANKOVA *et al.*, 2000; ARAUJO *et al.*, 2002; FUNARI e FERRO 2006).

No Brasil, pode-se encontrar diferentes tipos de própolis com constituições químicas bastante variáveis, sendo entre elas, a mais conhecida e estudada a própolis verde, predominante na região Sudeste (BARROS *et al.*, 2008). Na região Nordeste, em especial nos Estados de Sergipe e Alagoas, a própolis vermelha surge como outra variedade, a qual já demonstrou comprovada atividade antimicrobiana em ensaios preliminares *in vitro*, porém sua constituição química e atividade biológica ainda necessitam de estudos que melhor elucidem essas propriedades (ALENCAR *et al.*, 2007; BITTENCOURT, 2008).

O presente estudo teve como objetivo avaliar a própolis vermelha quanto a atividade antioxidante, teor de flavonóides, atividade gastroprotetora e antimicrobiana frente ao *Helicobacter pylori*.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Amostra

A amostra de própolis vermelha utilizada foi coletada de colméias de *Apis mellifera* L. proveniente do apiário Capivaras, situado no município de Brejo Grande/Sergipe/Brasil (S – 10°28'25" e W – 36°26'12") em dezembro de 2007. Quanto a análise sensorial a própolis demonstrou aroma balsâmico acentuado e cor vermelha. Na granulometria a amostra selecionada se apresentou heterogênea, não pulverizada, com pedaços de pequeno tamanho e consistência rígida a temperatura ambiente.

2.2.2 Obtenção do extrato

Os extratos hidroalcoólicos de própolis foram obtidos conforme Brito *et al.* (2006).

A extração foi realizada por maceração durante 24 horas em temperatura ambiente, sob agitação constante. O solvente extrator utilizado foi etanol a 70% (V/V) na proporção de 1:100 (m/v). Após período de extração, o solvente foi eliminado por rotaevaporação e os extratos secos armazenados em frasco âmbar sob refrigeração.

2.2.3 Determinação dos flavonóides

O teor de flavonóides presentes no extrato de própolis vermelha foi determinado utilizando método espectrofotométrico e expresso como equivalente de quercetina. A metodologia foi baseada no método descrito por Adelman (2005). A curva padrão foi obtida a partir de soluções etanólicas de quercetina, nas concentrações de 5 a 100 µg/mL. As amostras (0,5 mL) foram homogeneizadas com 1,5 mL de etanol, 0,1 mL de cloreto de alumínio a 10% (m/V), 0,1 mL de acetato de potássio 1 mol/L e 2,8 mL de água destilada. Após repouso de

40 minutos foi realizada a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 415 nm. O experimento foi realizado em triplicata.

2.2.4 Avaliação da atividade antioxidante

A determinação da atividade antioxidante foi realizada utilizando-se o método de reatividade contra o radical livre estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) descrito por Moreno *et al.*, (2000).

Um volume de 3 mL de extrato de própolis nas concentrações entre 2,5 e 15,0 mg/mL foi homogeneizado com 750 µL de solução de DPPH 200 mM. Após 15 minutos à temperatura ambiente foi realizada leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 517 nm. O controle (etanol 70%) foi submetido ao mesmo procedimento. O experimento foi realizado em triplicata.

O cálculo da % de inibição do radical livre foi realizado segundo a equação 1:

$$\%I = 100 - (A_C/A_A) \times 100 \quad (\text{Eq.1})$$

Na qual:

%I é a porcentagem de inibição do radical livre DDPH pela amostra em relação ao controle

A_C é a absorvância da solução controle

A_A é a absorvância da amostra na respectiva concentração.

O índice de inibição médio (IC50) foi determinado utilizando os valores de %I em cada concentração por regressão não linear utilizando o programa computacional Prisma.

2.2.5 Avaliação da atividade anti-Hp

Para realização do ensaio antimicrobiano utilizou-se a cepa de referência *Helicobacter pylori* ATCC 43504 cedida pelo Laboratório de Materiais de Referência da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS). Os meios utilizados nos experimentos foram caldo Brucella (HIMEDIA) e Mueller-Hinton (HIMEDIA).

A cepa padrão liofilizada foi reativada em caldo *Brucella* por 24 horas, obtendo-se uma suspensão das bactérias. Este material foi incubado por 48 horas em estufa bacteriológica a 37°C. Após turvação visível do caldo foi semeada por esgotamento para obtenção de colônias bem isoladas em Agar Mueller Hinton (HIMEDIA), suplementado com 10% de sangue de carneiro por um período de 48 horas em microaerofilia a 37°C.

A atividade antimicrobiana em placas foi determinada pela técnica de poços por difusão em agar. Nas placas contendo agar sangue (Mueller Hinton suplementado com sangue humano a 10%) foram realizadas perfurações de 9 mm de diâmetro. O semeio foi feito com o inóculo (0,5 da escala de McFarland) pela técnica de espalhamento. Nos poços foram colocados volumes de 80 µL da solução dos extratos hidroetanólicos de própolis vermelha em uma concentração de 10% (m/V). As placas foram incubadas a 37°C, por um período de 48 horas a 37°C. Os ensaios foram realizados em triplicata. A tetraciclina foi utilizada como controle positivo e o álcool a 70% como controle negativo.

2.2.6 Avaliação da atividade gastroprotetora

Antes da realização dos procedimentos *in vivo*, o projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Tiradentes (UNIT), sendo aprovado através do parecer Consubstanciado número 250608.

Ratos *Novergicus albinus* da linhagem wistar pesando 300 g $\pm$ 50 foram divididos em grupos de 6 ratos e mantidos em condições padronizadas, com ciclo claro-escuro de 12 horas, tratados com ração do tipo padrão (Labina) e água *ad libitum*. Após jejum de 24 horas, com acesso livre a água, foram realizados os tratamentos descritos na Tabela 4, a seguir.

Tabela 4 – Grupos tratados e seus correspondentes esquemas de dose

Grupo	Tratamento	Dose aplicada por massa corpórea do animal
Grupo controle salina	Solução salina 0,9%	10 mL/Kg
Grupo controle propilenoglicol	Propilenoglicol	10 mL/Kg
Grupo Cimetidina	Suspensão de cimetidina	100 mg/Kg
Grupo Omeprazol	Xarope de omeprazol	30 mg/Kg
Grupo Própolis	Extrato seco de própolis dissolvido em propilenoglicol	200 mg/Kg

A aplicação das substâncias foi realizada por via oral utilizando cânula de gavagem. Todos os animais, após 30 minutos da administração com os respectivos tratamentos, receberam 1,0 mL de etanol absoluto. Após 1 hora da administração do etanol, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e seus estômagos foram retirados, lavados com solução salina e abertos na sua maior curvatura para contagem das lesões ulcerativas e cálculos do índice de lesões ulcerativas (ILU), foram realizados segundo duas diferentes metodologias propostas por Gamberini (1991) método A e por Szelenyi e Thiemer (1979) método B.

Segundo metodologia descrita pelo método A as lesões foram contadas e classificadas de acordo com os parâmetros demonstrados na Tabela 5.

Tabela 5 – Parâmetros para contagem do índice de lesões ulcerativas pelo método A

Parâmetro	Limites	Escore (pontos)
Número de petéquias	Até 10	1
	Até 20	2
	Até 30	3
Número e dimensão das úlceras	de até 1 mm	*n x 2
	maiores que 1 mm	*n x 3
Hemorragia	Ausente	0
	Presente	1
Perda das pregas gástricas	Ausente	0
	Presente	1
Perda da coloração	Ausente	0
	Presente	1

*n= número de lesões encontradas.

Para a determinação da porcentagem de redução do ILU apresentados pelos grupos tratados em relação ao grupo controle, foi utilizada a equação 2:

$$\% \text{ de inibição do ILU} = \frac{\text{Média controle negativo} - \text{média tratado}}{\text{Média controle negativo}} \times 100 \quad (\text{Eq.2})$$

De acordo com a metodologia descrita pelo método B as lesões ulcerativas foram contadas e classificadas conforme demonstra a Tabela 6.

Tabela 6 – Parâmetros de classificação do índice de lesões ulcerativas pelo método B

Classificação da lesão	Parâmetro avaliado
Nível 1	pontos hemorrágicos < 1mm
Nível 2	úlceras de 2 mm de extensão
Nível 3	úlceras profundas de 3 mm de extensão

Para cada grupo de tratamento foi calculado um índice de lesão (ILU), obtido através da equação 3:

$$ILU = \Sigma (\text{lesões de nível 1}) + (\text{lesões de nível 2} \times 2) + (\text{lesões de nível 3} \times 3) \text{ (Eq. 3)}$$

A fórmula empregada no cálculo porcentual da análise do grau de inibição da úlcera nos grupos tratados foi a mesma utilizada pelo método A (equação 2).

Após avaliação macroscópica, os espécimes foram fixados em formol a 10%. Decorrido o período de 24 horas, as peças foram seccionadas transversalmente, desidratadas em álcool (Fmaia[®]), diafanizadas em xilol (Synth[®]) e incluídas em parafina sob a forma de blocos. Cortes histológicos com 5 µm de espessura foram obtidos utilizando um micrótomo (American Optical[®]) e as lâminas submetidas à coloração Hematoxilina/Eosina (HE) e observadas em um microscópio óptico (ZEISS, AXIOLAB[®]) em aumento aproximado de 40, 100 e 400X. Foram observadas as características morfológicas da mucosa gástrica, e descritas as alterações patológicas encontradas, tais como, focos de hemorragia, infiltração de células inflamatórias, distúrbios hemodinâmicos e sinais de necrose.

2.2.7 Análise estatística

Os dados foram apresentados através da média $\pm$ erro padrão e foram comparados utilizando a análise de variância (ANOVA), seguido de Dunnet e Tukey considerando valores significantes de $p < 0,05$.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade antimicrobiana de diferentes variedades de própolis tem sido comprovada por diversos autores e seu uso se consolida a partir destes resultados positivos. Estudos científicos já demonstraram a sua eficiência frente a bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Salmonella typhimurium* (MAZZUCO *et al.*, 1996; PARK e IKEGAKI, 1998; BANKOVA *et al.*, 1999). Em relação à variedade de própolis vermelha alguns autores já

demonstraram a sua eficiência antimicrobiana frente a diferentes microrganismos (BITTENCOURT, 2008; ARAUJO, 2009).

O presente trabalho demonstrou que a variedade de própolis vermelha, oriunda da região de Brejo Grande-SE apresentou atividade anti-Hp, onde halos médios de 13 ± 2 mm foram observados quando foi utilizado extrato hidroetanólico à 10%. Este resultado coincide com pesquisa realizada por Boyanova *et al.* (2003) onde obtiveram halos de inibição de 15 mm utilizando extrato etanólico de própolis búlgara. A capacidade de inibir o crescimento do *Helicobacter pylori* por outras variedades de própolis foi observado também por Ohsugi *et al.* (1997), Hashimoto *et al.* (1998), Banskota *et al.* (2001) e Boyanova *et al.* (2005). Nostro *et al.* (2006), obteve resultados positivos quando utilizou conjuntamente extrato de própolis de origem italiana a claritromicina, antibiótico que vem deixando de ser utilizado devido a crescente resistência microbiana a este fármaco.

Apesar das diferenças na composição química da própolis proveniente de localizações geográficas distintas, em sua maioria, o seu extrato tem demonstrado atividade antimicrobiana frente a algumas linhagens bacterianas, incluindo a *Helicobacter pylori*. As pesquisas atribuem esta atividade a ação sinérgica de inúmeras substâncias presentes na própolis, em especial os flavonóides (ARAUJO *et al.*, 2002; BOYANOVA *et al.*, 2003).

A busca pela identificação de substâncias que conferem a própolis vermelha atividade antimicrobiana tem sido objeto de estudos, os quais atribuem aos flavonóides a principal classe de substâncias com atividade biológica (BANSKOTA *et al.*, 2001). Fukai *et al.* (2002) demonstraram a ação anti-Hp dos flavonóides presentes em extratos de plantas oriundas da Turquia avaliados através de ensaios *in vitro*. Assim, alguns isoflavonóides como licoricidina, glabridina e glabrene foram identificados como responsáveis por essa atividade.

A própolis vermelha brasileira oriunda do Estado da Paraíba apresentou diversos tipos de flavonóides e tais moléculas têm sido testadas para algumas linhagens de células tumorais (LIU *et al.*, 2002). A própolis utilizada no presente estudo demonstrou teor de flavonóides de 0,31%, que apesar de estar dentro do valor mínimo esperado pela legislação vigente que é de 0,25% (BRASIL, 2001), mostra-se inferior aos encontrados por Bittencourt (2008), que obteve concentrações em torno de 1,8% para a mesma variedade de própolis. Apesar dos valores baixos de flavonóides na amostra estudada foi observada ação anti-Hp. A massa de extrato seco de própolis utilizada para obtenção do halo de inibição foi de 6 mg, o que equivale a 18,6 μ g de flavonóides. Bittencourt (2008) observou que a própolis vermelha demonstrou atividade antifúngica utilizando entre 1,5 μ g e 11,1 μ g de flavonóides.

Araujo (2009) observou que concentrações diferentes de própolis vermelha não possuíam proporcionalidade ao diâmetro dos halos de inibição observados. Tais resultados sinalizam para o fato de que provavelmente os flavonóides não sejam os únicos responsáveis pela ação antimicrobiana. Outra hipótese seria que talvez a partir de determinadas concentrações não existam diferenças significativas de resultados ou que a qualidade dos flavonóides presentes na amostra sejam relevantes ao ponto de influenciar na efetividade da resposta.

Uma grande diversidade de flavonóides tem sido descrita e classificada como isoflavonas, catequinas, flavonas, antocianidinas e flavonóis, com uma diversidade de efeitos biológicos, como anti-neoplásico, anti-inflamatório, hepatoprotetor, antihipertensivo e antiplaquetário e antioxidante (PICCINELLI *et al.*, 2005). A atividade antioxidante tem sido descrita em alguns estudos (OSHIMA *et al.*, 1998; MAGNANI *et al.*, 2000). Mora *et al.* (1990) e Cotellet *et al.* (1992), além da atividade antioxidante, verificaram ainda que os flavonóides atuam sobre radicais hidroxilas, devido sua capacidade de doar hidrogênio.

A própolis vermelha apresentou IC₅₀ de 294 µg/mL de própolis que equivale a 0,914 µg/mL de flavonóides no extrato seco. Esses resultados demonstram o potencial antioxidante da variedade de própolis estudada que provavelmente pode estar relacionada à sua capacidade de inibir a lesão do etanol sobre a mucosa gástrica. O etanol é metabolizado no organismo, liberando ânion superóxido e hidroperóxidos. Tais radicais livres estão envolvidos no mecanismo de ulceração aguda e crônica. O seqüestro destas entidades químicas tem papel importante no processo cicatricial da lesão gástrica (UMAMAHESWARI *et al.*, 2007).

Os radicais livres são entidades químicas capazes de gerar danos irreversíveis à célula. O processo antioxidante inclui o seqüestro destes radicais prevenindo a sua propagação, hidrólise enzimática da ligação éster para remover ácidos graxos peroxidados de lipídeos, seqüestro de íons metálicos de transição e redução de enzimas catalisadoras de peróxidos (ANDREOLI, 2000).

A patogênese da úlcera péptica está associada a fatores endógenos e exógenos. O etanol causa estresse oxidativo, que pode acontecer pela diminuição da liberação do óxido nítrico, o qual possui papel importante no metabolismo de radicais livres (BATISTA, 2003).

A capacidade da mucosa gástrica para resistir a ferimentos por secreções endógenas (ácido, pepsina e bile) e por ingestão de substâncias irritantes (por exemplo: álcool) pode ser atribuída a uma série de fatores que têm sido geralmente referidas como defesa da mucosa (WALLACE, 2001).

A formação de lesões da mucosa gástrica por agentes necrosantes, como o etanol, tem sido relatada por associar a depressão destes mecanismos de defesa gástrica (KINOSHITA *et al.*, 1995). Barros *et al.* (2008) demonstraram que a própolis verde pode atuar na defesa da mucosa gástrica e neste estudo, os autores observaram ainda que a própolis nas concentrações de 250 e 500 mg/kg possui atividade anti-secretora. A própolis vermelha apresentou inibição LU de 92,3% e 100,0% de acordo com os métodos A e B respectivamente (Tabela 7) utilizando a concentração de 200 mg/kg.

Tabela 7 – Valores médios de ILU seguido de erro padrão e percentuais de inibição da lesão ulcerativa por diferentes métodos

Tratamento	Aspecto da mucosa	Método A		Método B	
		ILU	Inibição LU (%)	ILU	Inibição LU (%)
Salina	Hemorragia e lesões intensas	8,0±5,3 ^a	_____	10,0±8,0 ^a	_____
Propilenoglicol	Sem hemorragia, mucosa irritada	4,0±3,5 ^{a,b}	38,5	2,2±1,8 ^{a,b}	69,2
Cimetidina	Hemorragia e lesões moderadas	4,8±3,0 ^{a,b}	30,7	2,0±1,6 ^{a,b}	69,2
Própolis vermelha	Sem hemorragia, mucosa íntegra	0,5±0,6 ^b	92,3	0,0±0,0 ^b	100,0
Omeprazol	Sem hemorragia, mucosa íntegra	0,2±0,4 ^b	97,9	0,0±0,0 ^b	100,0

*Letras iguais em uma mesma coluna significa valores estatisticamente semelhantes.

A análise histomorfológica das amostras gástricas mostrou importantes diferenças nos resultados entre os grupos estudados. Na análise do grupo controle (salina) pode-se observar uma mucosa gástrica, exibindo áreas extensas e múltiplas de alterações patológicas compatíveis com necrose fibrinóide (exulceração) da superfície epitelial (Figura 2.a1 e a3). Adicionalmente, a região do corpo do estômago apresentou intensa dilatação vascular e focos hemorrágicos permeando as glândulas fúndicas, sugerindo o início de uma reação de granulação (Figura 2.a2). A lâmina própria, de maneira geral, mostrou sinais de infiltração leucocitária de intensidade variando entre escassa a moderada, e discreta hiperemia capilar (Figura 2.a2).

Os resultados obtidos com o grupo salina apresentaram-se similares quando avaliados pelas metodologias A e B com ILU de 8 e 10 respectivamente. A salina não possui potencial gastroprotetor gerando uma maior intensidade de lesões e áreas hemorrágicas ocasionadas

pelo etanol. O etanol é responsável pela redução da produção do muco, diminuição do fluxo sanguíneo local, diminuição da secreção de bicarbonato e dos níveis de glutathione e prostaglandina endógena. Todos estes fatores compõem o sistema de defesa fisiológico da mucosa gástrica. Além disso, o etanol ativa os mecanismos que são considerados fatores agressores que podem ocasionar a ulceração. A presença de etanol aumenta a liberação de histamina, o influxo de íons cálcio e a geração de radicais livres e produção de leucotrienos (BARROS *et al.*, 2008).

O extrato de própolis vermelha apresenta baixa solubilidade em solventes aquosos (BITTENCOURT, 2008). Por este motivo, o propilenoglicol foi utilizado para diluição do extrato seco e desta maneira também foi submetido à avaliação.

Apesar dos valores de ILU obtidos pelos métodos A e B no grupo propilenoglicol serem inferiores (4,0 e 2,2 respectivamente) aos do grupo salina, esta diferença não foi considerada significativa estatisticamente ($p=0,1150$). Contudo, o propilenoglicol apresentou inibição de lesões de 38,46% (método A) e 69,23% (método B). Estes índices de inibição se confirmaram na avaliação histomorfológica do material. Nos animais tratados com propilenoglicol pode-se evidenciar o epitélio parcialmente preservado não demonstrando áreas de exulceração (Figura 2.b1), porém foram observadas áreas focais de hiperemia na camada submucosa (Figura 2.b2). O parênquima demonstrou a presença de alguns vasos hiperemiados e escassos linfócitos. No entanto, a maior extensão do epitélio foveolar mostrou-se bem definida assim como as glândulas fúndicas, sem sinais de hemorragia (Figura 2.b1e b3).

A cimetidina utilizada como controle no presente experimento apresentou resultados similares ao propilenoglicol ($p=0,9904$) e também ao grupo salina ($p=0,2647$), não demonstrando, portanto diferença estatística significativa em relação aos grupos citados. Porém, da mesma forma que o propilenoglicol foi possível observar potencial ação gastroprotetora indicada pelo índice de inibição e pela avaliação microscópica.

O grupo tratado com cimetidina apresentou mucosa gástrica mais preservada que o grupo controle. No entanto, foi possível identificar múltiplas áreas de exulceração secundárias à necrose fibrinóide da superfície epitelial (Figura 2.c1). Além disso, evidenciou-se intensa hiperemia entre as glândulas fúndicas (Figura 2.c2). Na lâmina própria pode-se observar moderada infiltração leucocitária mononuclear e focos de hemorragia (Figura 2.c2). Uma observação que deve ser destacada é que, mesmo nas áreas mais preservadas da mucosa gástrica, o epitélio foveolar se apresentou substituído por reação de granulação (Figura 2.c3), no entanto, as porções profundas se mostraram bem preservadas, embora já fosse possível verificar acúmulo leve de células inflamatórias crônicas na lâmina própria.

Quando tratados com omeprazol, os espécimes estudados demonstraram diferença significativa se comparado ao grupo salina ($p=0,0008$), porém não foi evidenciado alteração com significância estatística no ILU em relação aos demais grupos ($p>0,05$).

No estudo histomorfológico do grupo tratado com omeprazol foi possível evidenciar extensa área de preservação do epitélio foveolar (Figura 2.d1). As glândulas fúndicas mostraram-se bem definidas (Figura 2.d2) e as células parietais e principais apresentaram-se compatíveis com a normalidade (Figura 2.d3). Contudo foi possível observar poucas áreas focais de hiperemia e presença de ocasionais linfócitos da lâmina própria. O omeprazol é um fármaco muito utilizado como gastroprotetor, pois atua inibindo a bomba de prótons, e conseqüentemente a secreção de ácido clorídrico (GUIMARÃES *et al.*, 2006).

Os resultados obtidos com o grupo tratado com o extrato da própolis vermelha não demonstraram diferença significativa quando comparado ao grupo omeprazol ($p=0,9997$), o qual atualmente trata-se de um fármaco de referência para gastroproteção. No presente estudo foram obtidos importantes índices de inibição de lesão 92,3% e 100%, segundo os métodos A e B respectivamente.

No grupo tratado com extrato hidroalcólico de própolis vermelha, a mucosa gástrica se apresentou dentro dos padrões de normalidade em praticamente toda a mucosa (Figura 2.e1). A superfície epitelial exibiu epitélio foveolar preservado, glândulas fúndicas bem definidas, sem sinais de associação com manifestações morfológicas de distúrbios hemodinâmicos (Figura 2.e2) e porção profunda demonstrando células parietais e principais bem marcadas (Figura 2.e3). Na lâmina própria, apenas escassos linfócitos foram observados. Em apenas um espécime, foi observada a presença de foco superficial de necrose fibrinóide, mas esta alteração patológica se apresentou limitada a apenas uma pequena porção da mucosa.

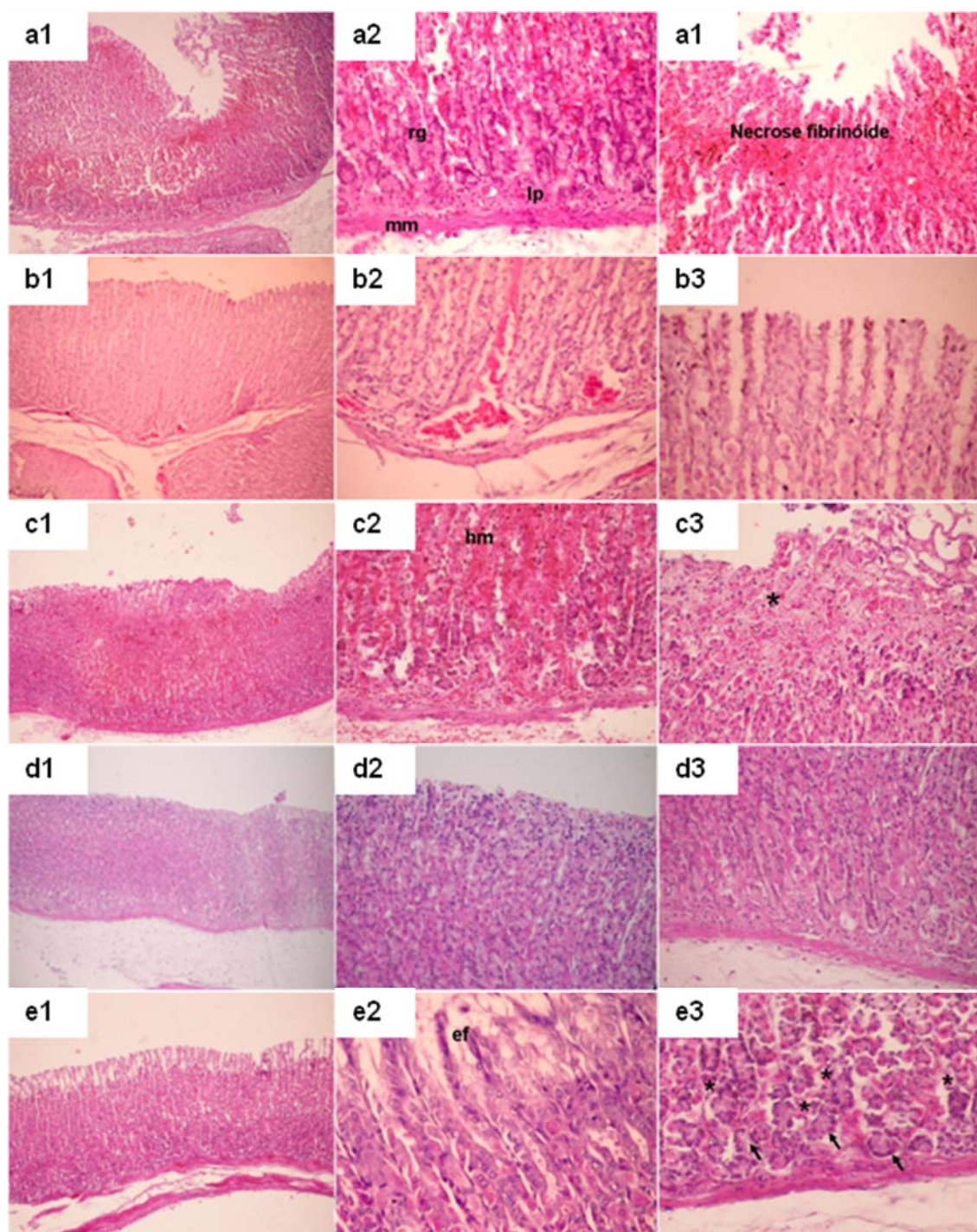


Figura 2 – Avaliação histomorfológica: (a) grupo salina, (b) grupo propilenoglicol, (c) grupo cimetidina, (d) grupo omeprazol, (e) grupo própolis; (1) aumento de 100X, (2 e 3) aumento de 400X; Legenda: região de granulação (rg), lâmina própria (lp), camada muscular da mucosa (mm), hemorragia (hm), epitélio foveolar (ef).

2.4 CONCLUSÃO

O extrato de própolis vermelha pode ser um potencial medicamento para utilização em lesões gástricas, uma vez que apresentou efetividade contra o crescimento de Hp e evidente ação gastroprotetora em modelos de indução de úlcera produzida por etanol. Apesar dos resultados do ILU não demonstrarem diferença significativa entre os grupos tratados com propilenoglicol, cimetidina, omeprazol e própolis vermelha, os achados histomorfológicos, bem como os índices de inibição do omeprazol e do extrato de própolis vermelha apresentaram resultados superiores para gastroproteção em relação aos demais grupos.

A presença de flavonóides, apesar de baixa, pode estar relacionada a atividade anti-Hp e gastroprotetora demonstrada, sugerindo que a qualidade desses compostos sejam tão importante quanto a quantidade.

A atividade antioxidante pronunciada pelo extrato de própolis vermelha demonstrou ser um importante fator responsável pela gastroproteção e supostamente tal função esteja relacionada a associação de flavonóides com outros compostos presentes na amostra.

O propilenoglicol apresentou atividade gastroprotetora, podendo ter agido de maneira sinérgica com o extrato de própolis. Estudos adicionais devem ser realizados para evidenciar a potencialidade gastroprotetora da própolis vermelha em outros solventes.

O método A mostrou-se mais adequado para a diferenciação do potencial gastroprotetor dos medicamentos testados, pois avalia de maneira mais detalhada a lesão formada.

REFERÊNCIAS

- ADELMANN, J. **Própolis**: Variabilidade Composicional, correlação com a flora e bioatividade antimicrobiana/antioxidante. Dissertação de mestrado, UFPR. Curitiba, 2005.
- ALENCAR, S.M.; OLDONI, T. L. C.; CABRAL, I.S.R.; COSTA-NETO, C. N.; CURY, J. A.; ROSALEN, P.L.; IKEGAKI, M. Chemical composition and biological activity of a newtype of Brazilian propolis: Red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**. 113, 278–283, 2007.
- ANDREOLI, T.E. Free radicals and oxidative stress. **Am. J. Med.** v. 108, p. 650-651, 2000.
- ARAUJO, C.E.P.; SHIMIZU, M.T.; CUNHA, I.B.S.; MARCUCCI, M.C.; RAMOS, O. H. P.; SAWAYA, A.C.H.F. Análise química, toxicológica e antiulcerogênica preliminar de uma amostra de própolis da região do Paraná. **Revista Lecta, Bragança Paulista**. v. 20, n. 1, p. 47-52, jan./jun. 2002.
- ARAUJO, Y.L.F.M. **Estudo da atividade antimicrobiana de variedades de própolis da região da Foz do Rio São Francisco – Brasil**. Dissertação de mestrado, UNIT, Aracaju-SE. 2009.
- BANKOVA, U. V.; CHRISTOV, R.; POPOV S.; MARCUCCI M.C.; TSVETKOVA I.; KUJUMGIEV A. **Antibacterial activity of essential oils from Brazilian propolis**. Fitoterapia 70, 190-193, 1999.
- BANKOVA, V.S.; CASTRO, S.L.; MARCUCCI, M.C.. **Propolis**: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* 31, 3–15, 2000.
- BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; ADNYANA, I. K.; ISHII, E.; MIDORIKAWA, K.; MATSUSHIGE, K.; KADOTA, S. Hepatoprotective and anti- Helicobacter pylori activities of constituents from Brazilian propolis. **Phytomedicine** 8, 16–23. (2001).
- BARROS, M.P.; LEMOS, M.; MAISTRO, E. L.; LEITE, M. F.; SOUSA, J. P. B.; BASTOS, J. K.; ANDRADE, S. F. Evaluation of antiulcer activity of the main phenolic acids found in Brazilian Green Propolis. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 120,p. 372–377, 2008.
- BATISTA, L. M. **Atividade Antiulcerogênica de Extratos e Frações obtidas dos escapos das espécies Syngonanthus bisulcatus Rul. e Syngonanthus arthrotrichus Silveira em modelos animais**. Tese de doutorado, UNICAMP. Campinas-SP, 2003.
- BIGUETTI, A.E. ; KOHN, M.A. ; L.K.,REHDER, V.L.G. ; FOGLIO, M.A. ; POSSENTI, A. ; VILELA, L.; CARVALHO, J.E. Antiulcerogenic activity of a crude hydroalcoholic extract and coumarin isolated from *Mikania laevigata* Schultz Bip. **Phytomedicine**. v. 12, 72–77, 2005.
- 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, 2008.
- BOYANOVA, L.; DEREJIAN, S.; KOUMANOVA, R.; KATSAROV , N.; GERGOVA, G.; MITOV , I.; NICOLOV, R.; KRASTEY, Z. Inhibition of Helicobacter pylori growth in vitro byBulgarian propolis: preliminary report. **Journal of Medical Microbiology**. 52, 417–419, 2003.

_____; GERGOVA, G.; NIKOLOV, R.; DEREJIAN, S.; LAZAROVA, E.; KATSAROV, N.; MITOV, I.; KRASSTEV, Z. Activity of Bulgarian propolis against 94 *Helicobacter pylori* strains in vitro by agar-well diffusion, agar dilution and disc diffusion methods. **Journal of Medical Microbiology**. v. 54, n. 5, p.481-483, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa nº3, de 19 de janeiro de 2001. Aprova os regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geléia Real, Geléia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis, conforme consta dos Anexos desta Instrução Normativa. **Diário Oficial da União de 23/01/2001**. Seção 1, página 18.

BRITO, K. P. P.; LEITE, J. O.; SOARES, V. T. B.; ARAÚJO, E. D.; MARCELLINI, P.S.; CARDOSO, J. C. Caracterização físico-química da própolis vermelha e influência nos cuidados de coleta. In: 16o. **Congresso Brasileiro de Apicultura, 2006**. Aracaju. Anais do 16o. Congresso Brasileiro de Apicultura. Aracaju, 2006.

CANIZARES, P.; GRACIA, I.; GOMEZ, L. A.; ARGILA, C. M.; BOIXEDA, D.; GARCIA, A.; RAFAEL, L. Allyl-thiosulfinates, the Bacteriostatic Compounds of Garlic against *Helicobacter pylori*. **Biotechnol. Prog.** v. 20. n. 1. 2004.

CHAN, F.K.; LEUNG, W.K. **Peptic ulcer disease**. Lancet 360, 933–941, 2002.

COTELLE, N.; BERNIER, J.L.; HENICHART, J.P.; CATTEAU, J.P.; GAYDOU, F.; WALLET, J.C. Scavenger and antioxidant properties of ten synthetic flavones. **Free Radical Bio Med** 12: 211-219, 1992.

FUKAI, T.; MAMURO, A.; KAITOU, K.; KANDA, T.; TERADA, S.; NOMURA, T. Anti-*Helicobacter pylori* flavonoids from licorice extract. **Elsevier Science Inc.** v. 9. august 2002, p. 1449-1463, 2002.

FUNARI C.S.; FERRO V.O. **Análise de própolis**. Ciência e Tecnologia Alimentar. Campinas-SP, 26(1): 171-178, 2006.

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.

HASHIMOTO, T.; AGA, H.; TABUCHI, A. Anti-*Helicobacter pylori* compounds in Brazilian propolis. **Nature Medicine**. v. 52, p. 518-520, 1998.

JAINU, M.; DEVI, C.S.S. Antiulcerogenic and ulcer healing effects of *Solanum nigrum* (L.) on experimental ulcer models: Possible mechanism for the inhibition of acid formation. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 104, 156–163, 2006.

KINOSHITA, M.; TSUNEHISA, N.; TAMAKI, H. Effect of a combination of ecabet sodium and cimetidine on experimentally induced gastric-lesions and gastric-mucosal resistance to ulcerogenic agents in rats. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. 18, 223–226. 1995.

LIMA, Z.P.; SEVERI, J.A.; PELLIZZON, C.H.; BRITO, A.R.M.S.; SOLIS, P.N.; CACERES, A.; GIRÓN, L.M.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C.A. Can the aqueous decoction of mango flowers be used as antiulcer agent? **Journal of Ethnopharmacology**. 106, 29–37, 2006.

LIU, C.F.; LIN, C.C.; LIN, M.H.; Lin, Y.; LIN, S.C. Cytoprotection by Propolis Ethanol Extract of Acute Absolute Ethanol-Induced Gastric Mucosal Lesions. **The American Journal of Chinese Medicine**. v. 30, 245–254, 2002.

LOURENÇO, K. G.; OLIVEIRA, R. B. Abordagem do paciente com hemorragia digestiva alta não varicosa. **Medicina**. Ribeirão Preto-SP. 36:261-5, 2003.

MAGNANI L.; GAYDOU E.M.; HUBAUD JC. Spectrophotometric measurement of antioxidant properties of flavones and flavonols against superoxide anion. **Anal Chim Acta**. 411: 209-216, 2000.

MAZZUCO, H.; SILVA, R.D.; BERCHIERI JÚNIOR, A.; OLIVEIRA, E. Utilização da própolis e álcool etílico no controle de *Salmonella* em rações avícolas. **Scientia Agricola**. v. 53, p.1-5, 1996.

MILLER, J.P.; FARAGUER, E.B. Relapse of duodenal ulcer: does it matter which drug is used in initial treatment. **British Medical Journal**. 293, 1117–1118, 1986.

MORA, A.; PAYÁ M.; RIOS J.L.; ALCARAZ, M.J. **Structure-activity relationships of polymetoxylavones and other flavonoids as inhibitors of non enzymic lipid peroxidation**. **Biochem Pharmacol** 40: 793-797, 1990.

MORENO, M. I. N.; ISLA, M. I.; SAMPIETRO, A. R.; VATTUONE, M. A. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 71, p. 109-114, 2000.

NOSTRO A.; CELLINI L.; DI BARTOLOMEO, S.; DI CAMPLI, E.D.; GRANDE, R.; CANNATELLI, N.A.; MARZIO, L.; ALONZO, V. Antibacterial Effect of Plant Extracts against *Helicobacter pylori*. **Phytother. Res.** 19, 198–202, 2005.

NOSTRO A.; CELLINI L.; DI BARTOLOMEO; CANNATELLI, N.A.; DI CAMPLI, E.D.; PROCOPIO, F. S.; GRANDE, R.; MARZIO, L.; ALONZO, V. Effects of Combining Extracts (from Propolis or *Zingiber officinale*) with Clarithromycin on *Helicobacter pylori*. **Phytother. Res.** 20, 187–190, 2006.

OCHI, T.; SHIBATA, H.; HIGUTI, T.; KODAMA, K.; KUSUMI, T.; TAKAISHI, Y. *Anti-Helicobacter pylori Compounds from Santalum album*. **Journal of Natural Products**. v. 68. n. 6, 2005.

OHSUGI, M.; BASNET, P.; KADOTA, S. Antibacterial activity of traditional medicines and an active constituent lupulone from *Humulus lupulus* against *Helicobacter pylori*. **Journal of Traditional Medicines**. v.14, p.186-191, 1997.

OSHIMA H.; YOSHIE Y.; AURIOL S.; GILBERT I. Antioxidant and pro-oxidant actions of flavonoids: effects on DNA damage induced by nitric oxide, peroxytrifluoromethane and nitroxyl anion. **Free Radical Bio Med** 25: 1057-1065, 1998.

PARK, Y.K.; IKEGAKI, M. Preparation of water and ethanolic extracts of propolis and evaluation of the preparations. **Biosci Biotechnol Biochem**. v. 62, p.2230-2232, 1998.

PICCINELLI, A.L.; FERNANDEZ, M.C.; CUESTA-RUBIO, O.; HERNÁNDEZ, I. M.; DE SIMONE, F.; RASTRELLI, L. Isoflavonoids Isolated from Cuban Propolis. **J. Agric. Food Chem**. v. 53, p. 9010-9016. 2005.

ROCHA, G. R.; STEIN, R.; GUIMARÃES, M.R.; RIBEIRO, J. P. Resposta cronotrópica ao teste cardiopulmonar após o uso de cimetidina. **Arq. bras. cardiol**. 86(3):206-210, 2006.

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

UMAMAHESWARI, M.; ASOKKUMAR, K.; RATHIDEVI, R.; SIVASHANMUGAM, A.T.; SUBHADRADEVI, V.; RAVI T.K. Antiulcer and *in vitro* antioxidant activities of *Jasminum grandiflorum* L. **Journal of Ethnopharmacology**. 110, 464–470, 2007.

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

WOLFE, M. M.; SANCHES, G. Acid suppression: optimizing therapy for gastroduodenal ulcer healing, gastroesophageal reflux disease and stress-related erosive syndrome. **Gastroenterology**. 118:s9-s31, 2000.

CAPÍTULO 3

AVALIAÇÃO DA POTENCIAL GASTROPROTETOR DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE MANGABA E CAJU

Resumo

A úlcera péptica é considerada um importante problema de saúde em todo o mundo. Fatores relacionados aos hábitos de vida da atualidade associados à infecção por *Helicobacter pylori* tem aumentado os índices de acometimento desse agravo. Diversas pesquisas têm identificado substâncias naturais que possuem ação efetiva de gastroproteção e a etnofarmacologia tem apontado que a mangaba e o caju são utilizados pela população brasileira, em especial na região Nordeste, como tratamento alternativo para tal finalidade. Pesquisas demonstram algumas atividades biológicas importantes da mangaba e do caju, contudo, estudos que melhor caracterizem atividades relacionadas ao potencial gastroprotetor ainda são escassos. Dessa forma, o presente trabalho tem por objetivo avaliar o potencial gastroprotetor do fruto da mangaba e pseudofruto do caju. Para tanto foi realizado a extração hidroalcóolica das amostras estudadas através de maceração para posterior determinação da atividade anti-Hp, teor de flavonóides, atividade antioxidante e potencial gastroprotetor através de análises macroscópicas e histomorfológicas. O ensaio microbiológico foi realizado por difusão em agar pelo método de poços, a quantificação de flavonóides foi obtida através de espectrofotometria utilizando um padrão de quercetina e a atividade antioxidante foi determinada através do seqüestro de radical livre por DPPH. A indução da lesão foi realizada por etanol e índice de lesão ulcerativa (ILU) foi calculado por duas metodologias distintas. Os resultados demonstraram que os espécimes estudados, nas condições desse experimento, não possuem atividade anti-Hp. Os extratos da mangaba e do caju apresentaram teor de flavonóides de 0,20% e 0,15% e IC50 para atividade antioxidante de 0,597 e 0,285 mg/mL respectivamente. A análise histomorfologica demonstrou um potencial citoprotetor da mangaba maior que o caju e similar a da cimetidina, que é um fármaco utilizado comumente como gastroprotetor. Portanto, pode-se concluir que os extratos hidroetanólicos de mangaba e caju demonstraram potencial citoprotetor possivelmente atribuído à presença de flavonóides, mesmo não demonstrado atividade anti-Hp.

Palavras-chave: Úlcera péptica; mangaba; caju; potencial gastroprotetor.

Abstract

The peptic ulcer is considered a major health problem worldwide. Factors related to current living habits associated to *Helicobacter pylori* infection have increased these disease rates of onset. Several studies have identified natural substances that have effective gastric protector action and ethno pharmacology has indicated that mangaba and cashew are used by Brazilian population, especially in the Northeast, as alternative treatment for this purpose. Researches show some important biological activities of mangaba and cashew, however, studies to better characterize related activities to the gastric protector potential are still scarce. Thus, this study aims to evaluate mangaba fruit and cashew pseudo fruit gastric protector potential. For this it was made the extraction of hydro alcoholic samples through maceration for later determination of anti-HP activity, content of flavonoids, antioxidant activity and gastric protector potential through macroscopic and histomorphological analysis. The microbiological testing was carried out by diffusion in agar by means of wells, the quantification of flavonoids was obtained by spectrophotometry using a standard of quercetin and the antioxidant activity was determined by the sequestration of free radical by DPPH. The induction of the lesion was performed by ethanol and ulcerative lesion index (ILU) was calculated by two different methodologies. The results showed that the specimens under the conditions of this experiment do not have active anti-Hp. The extracts of cashew and mangaba presented content of flavonoids of 0.20% and 0.15% and IC50 for antioxidant activity of 0597 and 0285 mg / mL respectively. Histomorphological studies showed mangaba cytoprotectant potential larger than cashew and similar to cimetidina, that is that a drug commonly used as gastric protector. Therefore it was concluded that hydro alcoholic extracts of mangaba and cashew demonstrated cytoprotectant potential possibly attributed to the presence of flavonoids, even though it has not shown anti-HP activity.

Key-words: Peptic ulcer, mangaba, cashew, gastric protector potential.

3.1 INTRODUÇÃO

A úlcera péptica é um agravo que acomete um número considerável de pessoas em todo o mundo. Fatores associados ao estresse, tabagismo, alcoolismo, infecção por *Helicobacter pylori* (Hp) e uso de anti-inflamatórios não esteroidais potencializam o índice de acometimento dessa lesão (VONKEMAN *et al.*, 2007).

Diversas pesquisas demonstraram que uma ampla variedade de componentes químicos isolados a partir de produtos naturais apresenta potencial gastroprotetor e ação anti-Hp (KUBO, J *et al.*, 1999; CANIZARES *et al.*, 2004; OCHI *et al.*, 2005). A etnofarmacologia tem demonstrado que algumas plantas brasileiras são utilizadas no tratamento de distúrbios gástricos, e particularmente, no Nordeste do Brasil, a mangaba e o caju são empregadas para tal finalidade (BARCELOS *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2007).

O fruto da mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) é consumido naturalmente ou usado como matéria prima na agroindústria. O suco leitoso do fruto e o látex desta espécie são utilizados na

medicina popular como medicamento caseiro no tratamento de agravos como tuberculose e úlcera gástrica (NOGUEIRA e SAMPAIO, 2006). A casca do caule demonstrou atividade gastroproterora e potencial anti-Hp em estudo realizado por Moraes *et al.* (2008).

O *Anacardium occidentale* L. (cajueiro) é uma árvore de grande importância econômica no Brasil (BRITO *et al.*, 2007). Trata-se de um vegetal que pode ser encontrado em diversas regiões do país e diferentes componentes deste vegetal como a casca do caule, as folhas e fruto demonstraram algumas propriedades biológicas importantes como anti-inflamatório, antimicrobiano, antihipertensivo, antipirético e no tratamento de distúrbios gástricos (LAURENS *et al.*, 1992; KUBO, J *et al.*, 1999; BARCELOS *et al.*, 2007). Contudo, pesquisas que melhor caracterizem as propriedades biológicas do pseudofruto ainda são escassas e estudos que elucidem essas características ainda se fazem necessários.

Portanto, o presente estudo teve como objetivo a avaliação dos extratos brutos do fruto da mangabeira e pseudofruto do caju referentes à sua atividade antioxidante, teor de flavonóides, potencial gastroprotetor e atividade antimicrobiana frente ao *Helicobacter pylori*.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Amostra

Os frutos da mangabeira e do cajueiro foram obtidos no mercado local (Aracaju/SE) em estágio intermediário de maturação.

Para avaliação da atividade anti-Hp utilizou-se a cepa padrão de *Helicobacter pylori* ATCC 4350, cedida pelo Laboratório de Materiais de Referência da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS). Os meios utilizados nos experimentos foram caldo Brucella (HIMEDIA) e Mueller-Hinton (HIMEDIA).

3.2.2 Preparo dos extratos

O fruto e pseudofruto da mangaba e do cajueiro, respectivamente, foram fracionados em pequenos fragmentos e levados à estufa na temperatura de 40°C, até secagem total do material. O material foi então pesado (20g) e submetido à maceração (temperatura ambiente/agitação) por 24 horas, utilizando como agente extrator o etanol 70%. Após este período, os extratos foram filtrados a vácuo e os solventes eliminados por evaporação. Os extratos secos foram novamente dissolvidos em álcool 70% na concentração de 10% m/v e armazenados em frasco âmbar sob refrigeração.

3.2.3 Determinação da concentração de flavonóides

O teor de flavonóides presentes no extrato de mangaba e caju foi determinado através de espectrofotometria e expresso como equivalente de quercetina. Foi utilizada a metodologia proposta por Adelman (2005). A curva padrão foi obtida a partir de soluções etanólicas de quercetina, nas concentrações de 5 a 100 µg/mL. As amostras (0,5 mL) foram homogeneizadas com 1,5 mL de etanol, 0,1 mL de cloreto de alumínio a 10% (m/V), 0,1 mL de acetato de potássio 1 mol/L e 2,8 mL de água destilada. Após repouso de 40 minutos foi realizada a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 415 nm. O experimento foi realizado em triplicata.

3.2.4 Avaliação da atividade antioxidante

A determinação da atividade antioxidante foi realizada seguindo o método descrito por Moreno *et al.*, (2000) utilizando-se o método de seqüestro do radical livre estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH).

Um volume de 3 mL dos extratos nas concentrações entre 2,5 e 15,0 mg/mL foi homogeneizado com 750 µL de solução de DPPH 200 mM. Após 15 minutos à temperatura ambiente foi realizada leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 517 nm. O

controle (etanol 70%) foi submetido ao mesmo procedimento. O experimento foi realizado em triplicata.

O cálculo da % de inibição do radical livre foi realizado segundo a equação 1:

$$\%I = 100 - (A_C/A_A) \times 100 \quad (\text{Eq.1})$$

Na qual:

%I é a porcentagem de inibição do radical livre DDPH pela amostra em relação ao controle

A_C é a absorvância da solução controle

A_A é a absorvância da amostra na respectiva concentração.

O índice de inibição médio (IC50) foi determinado utilizando os valores de %I em cada concentração por regressão não linear utilizando o programa computacional Prisma.

3.2.5 Avaliação da atividade Anti-Hp

A cepa liofilizada foi inoculada inicialmente em caldo *Brucella* para reativação, subseqüentemente o material foi incubado por 48 horas em estufa bacteriológica a 37°C. Após turvação visível do caldo foi semeada por esgotamento em agar Mueller Hinton (HIMEDIA), suplementado com 10% de sangue de carneiro por um período de 48 horas em jarra de microaerofilia a 37°C.

A atividade antimicrobiana foi determinada pela técnica de poços por difusão em agar. Nas placas contendo agar sangue (Mueller Hinton suplementado com sangue de carneiro a 10%) foram realizadas perfurações de 9 mm de diâmetro. O semeio foi feito com o inóculo (0,5 da escala de McFarland) pela técnica de espalhamento. Nos poços foram colocados volumes de 80 µL da solução dos extratos hidroetanólicos de mangaba e caju em concentração de 10% (m/V). As placas foram incubadas 37°C, por um período de 48 horas a 37°C. Os ensaios foram realizados em triplicata. A tetraciclina foi utilizada como controle positivo e o álcool a 70% como controle negativo.

3.2.6 Avaliação do potencial gastroprotetor

Ratos *Novergicus albinus* da linhagem wistar, machos, pesando 300 g $\pm$ 50 foram divididos em grupos de 6 ratos e mantidos em condições padronizadas, com ciclo claro-escuro de 12 horas, tratados com ração do tipo padrão (Labina) e água *ad libitum*. Após jejum de 24 horas, com acesso livre a água foram realizados os tratamentos descritos na Tabela 8.

Tabela 8 – Grupos de tratamentos e esquema de doses utilizadas

Grupo	Tratamento	Dose / massa corpórea
Grupo Salina	Solução salina 0,9%	10 mL/Kg
Grupo Omeprazol	Xarope de omeprazol	30 mg/Kg
Grupo Cimetidina	Suspensão aquosa de cimetidina	100 mg/Kg
Grupo Caju	Extrato seco de caju em solução salina	200 mg/Kg
Grupo Mangaba	Extrato seco de mangaba em solução salina	200 mg/Kg

Fonte: Pesquisa própria.

A administração dos extratos e substâncias controle foi realizada por via oral utilizando cânula de gavagem. Todos os animais, após 30 minutos da administração com os respectivos tratamentos, receberam 1,0 mL de etanol absoluto (Fmaia®). Após 1 hora da administração do etanol, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e seus estômagos foram retirados, lavados com solução salina e abertos na sua maior curvatura para contagem das lesões ulcerativas e os cálculos do índice de lesões ulcerativas (ILU) foram realizados segundo duas diferentes metodologias propostas por Gamberini *et al.* (1991) método A e por Szelenyi e Thiemer (1979) método B.

Segundo método A as lesões foram contadas e classificadas de acordo com os parâmetros demonstrados na Tabela 9.

Tabela 9 – Parâmetros para contagem do índice de lesões ulcerativas pelo método A

Parâmetro	Limites	Escore (pontos)
Número de petéquias	Até 10	1
	Até 20	2
	Até 30	3
Número e dimensão das úlceras	até 1 mm	*n x 2
	> 1 mm	*n x 3
Hemorragia	Ausente	0
	Presente	1
Perda das pregas gástricas	Ausente	0
	Presente	1
Perda da coloração	Ausente	0
	Presente	1

*n= número de lesões encontradas

Fonte: Pesquisa própria.

Para a determinação da porcentagem de redução das LU apresentados pelos grupos tratados em relação ao grupo controle, foi utilizada a equação 2:

$$\% \text{ de inibição das LU} = \frac{\text{Média controle negativo} - \text{média tratado}}{\text{Média controle negativo}} \times 100 \text{ (Eq.2)}$$

De acordo com a metodologia descrita pelo método B as lesões ulcerativas foram contadas e classificadas conforme demonstra a Tabela 10.

Tabela 10 – Parâmetros classificatórios do índice de lesões ulcerativas pelo método B

Classificação da lesão	Parâmetro avaliado
Nível 1	pontos hemorrágicos < 1mm
Nível 2	úlcera de 2 mm de extensão
Nível 3	úlceras profundas de 3 mm de extensão

Fonte: Pesquisa própria.

Para cada grupo de tratamento foi calculado um índice de lesão (ILU), obtido através da equação 3:

$$\text{ILU} = \Sigma (\text{lesões de nível 1}) + (\text{lesões de nível 2} \times 2) + (\text{lesões de nível 3} \times 3) \text{ (eq. 3)}$$

A fórmula que foi empregada no cálculo percentual da análise do grau de inibição da úlcera nos grupos tratados está descrita na equação 2:

3.2.7 Avaliação histomorfológica

Após avaliação macroscópica, os espécimes foram acondicionados em recipientes contendo formol a 10% para fixação. Decorrido o período de 24 horas para a fixação, as peças foram seccionadas transversalmente, desidratadas em álcool (Fmaia[®]), diafanizadas em xilol (Synth[®]) e incluídas em parafina sob a forma de blocos. Os blocos foram montados em micrótomo (American Optical[®]) e obtidos cortes com 5 µm de espessura. De cada animal foi confeccionada uma lâmina com cerca de 3 secções cada, a qual foi submetida à coloração Hematoxilina/Eosina (HE) e observados em um microscópio de luz ZEISS, AXIOLAB[®]. Foram observadas as características morfológicas da mucosa gástrica, e descritas as alterações patológicas encontradas, a exemplo de focos de hemorragia, infiltração de células inflamatórias, distúrbios hemodinâmicos e sinais de necrose.

3.2.8 Análise estatística

Os dados foram apresentados através da média $\pm$ erro padrão e foram comparados utilizando a análise de variância (ANOVA), seguido de Dunnet e Tukey, considerando valores significantes de $p < 0,05$.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A etnofarmacologia brasileira demonstra que uma larga variedade de produtos naturais é utilizada como fonte terapêutica para distúrbios gástricos (ASSUNÇÃO e MERCADANTE, 2003; MORAES *et al.*, 2008). No Nordeste do Brasil, a mangaba e o caju vem sendo utilizados com tal finalidade. Estudos que comprovem a real atividade desses vegetais tem se mostrado de suma importância no sentido de comprovar cientificamente o censo comum da população.

Nos testes utilizando cepa ATCC 43504 de Hp não foram evidenciados halos de inibição para os extratos hidroalcoólicos do fruto da mangaba e pseudofruto do caju nas concentrações estudadas.

Em estudo realizado por Kubo, J *et al.* (1999), a concentração de ácidos anacárdicos encontrados no suco do pseudofruto do caju foi de 0,00006%. Na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$ destes fenóis, os autores evidenciaram que a fração etil-acetato do extrato etanólico demonstrou efetividade contra o Hp.

No presente experimento utilizou-se o extrato bruto hidroalcoólico do caju a 10% (m/V), que proporcionalmente, baseando-se teor de ácidos anacárdicos obtido por Kubo, J *et al.* (1999) equivale a de 0,6 $\mu\text{g/mL}$ na amostra estudada. Esta concentração é muito baixa quando comparada àquela que os autores utilizaram. Desta forma, concentrações mais altas deste extrato possivelmente trarão resultados diferentes destes encontrados. Outro ponto a ser salientado, é que a extração realizada neste trabalho foi hidroetanólica por 24 horas, enquanto Kubo, J *et al.* (1999) utilizaram como solvente extrator álcool etílico absoluto e não descreveram o tempo de maceração. A diferença da qualidade das moléculas extraídas pode estar relacionada diretamente com o sistema solvente e o tempo de extração. Desta

forma, é necessário que estudos posteriores investiguem o método e solvente extrator mais adequado para a efetividade anti Hp do pseudofruto do cajueiro.

O teor de flavonóides encontrado com extrato de caju foi de 0,15% e o IC 50 para atividade antioxidante de 0,285 mg/mL. A atividade antioxidante evidenciada no extrato pode ter influenciado no índice de inibição de lesões gástricas que apresentou 30,8% (método A) e 36% (método B) (Tabela 11).

Tabela 11 – Valores médios, erro padrão de ILU e percentuais de inibição da lesão ulcerativa por diferentes métodos

Tratamento	Aspecto da mucosa	Método A		Método B	
		ILU	Inibição LU (%)	ILU	Inibição LU(%)
Salina	Hemorragia, vários pontos de úlcera e petéquias	6,5±5,3 ^a	—	6,5±8,0 ^a	—
Omeprazol	Sem hemorragia, mucosa íntegra	0,2±0,4 ^b	97,9	0,0±0,0 ^b	100,0
Cimetidina	Hemorragia, úlceras 1mm	4,5±3,0 ^a	30,7	2,0±1,5 ^b	69,2
Mangaba	Hemorragia, úlceras 1mm	3,5±3,6 ^a	46,2	1,5±1,8 ^b	76,9
Caju	Hemorragia, úlceras 1mm	3,5±3,6 ^a	30,8	4,2±2,0 ^{a,b}	36,0

*Letras iguais em uma mesma coluna corresponde a valores estatisticamente semelhantes.

No grupo tratado com extrato de caju os espécimes demonstraram áreas de hiperemia compatíveis com exulceração, epitélio foveolar substituído por reação de granulação. As porções mais profundas exibiam reação inflamatória bem definida com a presença de dilatação vascular aliada a focos hemorrágicos (Figura 3.e3).

Esses resultados demonstraram que nas condições do presente estudo o extrato hidroetanólico administrado na dose de 200 mg/kg não demonstrou elevada efetividade no processo de gastroproteção de lesão induzidas por etanol. Ferreira (2005), pesquisando uma variedade de caju, encontrou 82% de inibição de lesões, essa diferença pode ser consequência da dose de extrato metanólico que foi de 250 mg/kg e o solvente extrator que foi utilizado. Sendo assim, os resultados indicam que o método de extração ou solvente utilizado, bem como a concentração do extrato pode ter influenciado negativamente na extração de substâncias bioativas essenciais para o processo de gastroproteção.

O extrato hidroetanólico de mangaba, assim como o de caju, não demonstrou atividade anti-Hp. Esse resultado pode ser devido à concentração baixa de flavonóides exibida que foi de 0,20%. Segundo Moraes *et al.* (2008) a presença de derivados de ácidos fenólicos,

catequinas e proantocianina no extrato etanólico estão relacionados a atividade anti-Hp. Nesse estudo foi verificado que a concentração inibitória mínima foi de 125 µg/mL.

Segundo Wittschier *et al.* (2007), vegetais ricos em proantocianidina apresentam atividade anti-adesiva do Hp. Ainda segundo os autores as catequinas e as proantocianidinas são flavonóides com alta capacidade antioxidante. No presente estudo, o extrato hidroetanólico apresentou um IC₅₀ de 0,567 mg/mL. A atividade antioxidante apresentada pode estar ligada ao mecanismo de citoproteção gástrica deste extrato o qual exibiu uma inibição de 46,2% pelo método A e 76,9% pelo método B das lesões, o que pode ser observado na análise histomorfológica.

Nos animais tratados com mangaba observou-se, a presença de extensas áreas de necrose fibrinóide da superfície epitelial compatíveis com exulceração (Figura 3.c1). Na Figura 3.c2 pode-se observar moderada hiperemia entre às glândulas fúndicas associada a focos hemorrágicos. Na lâmina própria, verificaram-se áreas focais de extravasamento de hemácias e escasso infiltrado inflamatório mononuclear (Figura 3.c3). No entanto, pode-se perceber que nas regiões menos afetadas da mucosa não foram evidenciadas importantes alterações no epitélio foveolar. Este demonstrou-se preservado sem sinais de substituição por reação de granulação. Nas porções mais profundas ocupadas pelas glândulas fúndicas não foram observados indícios de alterações morfológicas que indiquem distúrbios hemodinâmicos. Apesar da eventual evidenciação de poucos vasos capilares dilatados e ocasionais células inflamatórias mononucleares, a lâmina própria exibia características de normalidade.

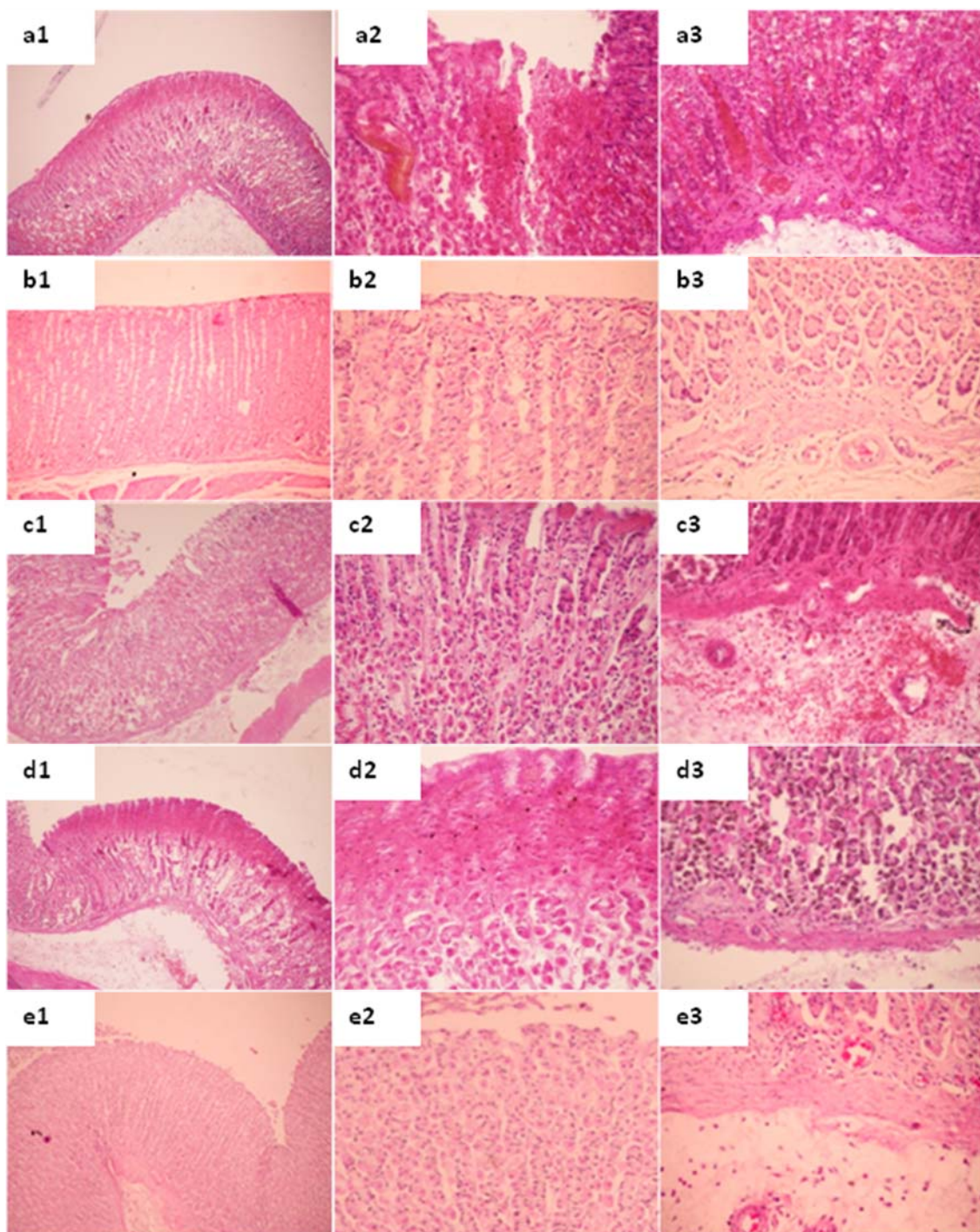


Figura 3 – Avaliação histomorfológica: (a) grupo salina, (b) grupo omeprazol, (c) grupo mangaba, (d) grupo cimetidina, (e) grupo caju; (1) aumento de 100X, (2 e 3) aumento de 400X.

Os resultados obtidos no presente trabalho podem ser associados aos flavonóides presentes na amostra haja vista que segundo Ferreira (2005), esses compostos auxiliam no aumento da vascularização através da vasodilatação do endotélio que pode ser explicada pela abertura de canais de potássio, fato este influencia positivamente no processo cicatricial.

Segundo Guimarães *et al.* (2006) e Rocha *et al.* (2006) os medicamentos mais utilizados atualmente com o propósito de promover a gastroproteção atuam basicamente na inibição

da bomba de prótons e como antagonista H_2 , porém nenhum deles tem a propriedade de aumentar a vascularização local com o intuito de promover a cicatrização, o que torna o extrato da mangaba um agente promissor para tal finalidade.

A atividade gastroprotetora do extrato da mangaba foi similar a da cimetidina, fármaco amplamente utilizado, com ação anti-histamínica, porém difere da ação obtida nos grupos tratados com omeprazol que possui ação baseada na inibição da bomba de prótons (GUIMARÃES *et al.*, 2006). A ação anti histamínica, bem como o aumento dos níveis de prostaglandina endógena e captura dos oxigênios derivados de radicais livres pode ser relacionada à presença de flavonóides que podem ser encontrados em produtos naturais (JUNG, *et al.*, 2005).

Os dados obtidos nas análises da atividade antioxidante dos extratos de mangaba e caju indicaram que não há diferença significativa ($p>0,05$). A presença de substâncias antioxidantes pode estar relacionada com a atividade gastroprotetora, já que os radicais livres são um fator predisponente para doenças gástricas (KUBO, I *et al.*, 2006; TREVISAN *et al.*, 2006).

A utilização de duas metodologias para contagem e classificação das lesões ulcerativas faz-se importante, pois a partir destas foi possível observar diferentes índices de inibição de lesões ulcerativas, os quais apresentaram resultados bastante discrepantes. O método A, mesmo tendo demonstrado índices de inibição de lesões ulcerativas menores que o B, mostra-se mais criterioso ao avaliar a atividade gastroprotetora dos extratos testados, pois este não só avalia a extensão de úlceras como também a quantidade de petéquias, presença de hemorragia, perda das pregas gástricas e perda de coloração. Por outro lado, o método B mostra-se ineficaz na classificação de lesão de substâncias que possuam potencial gastroprotetor intermediário a exemplo dos extratos de mangaba e caju desse estudo. Desse modo, a mangaba avaliada sob os critérios do método A demonstrou um maior potencial gastroprotetor em relação ao caju, o que foi também evidenciado na análise histomorfológica.

No grupo controle negativo (salina) foram encontrados sinais de lesões vasculares compatíveis com necrose fibrinóide na superfície epitelial na mucosa gástrica (Figura 3.a1), bem como regiões sugestivas de reação de granulação devido a intensa dilatação vascular e focos hemorrágicos permeando as glândulas fúndicas (Figura 3.a2 e 3.a3). Este efeito pode ter sido ocasionado devido ao contato direto do etanol com as células endoteliais. O etanol é fator determinante para formação das lesões gástricas por provocar a destruição da camada de muco e inibição da secreção de bicarbonato. Ambos possuem funcionalidade na

proteção do epitélio contra as secreções ácidas do estômago. Este agente indutor de úlceras interfere na citoproteção por precipitar proteínas, liberar radicais livres e reduzir a concentração de compostos sulfidrilas nas células da mucosa (OATES e HAKKININ, 1988; BARROS *et al.*, 2008).

O grupo salina demonstrou resultados compatíveis em ambas metodologias, confirmando que essa não possui atividade gastroprotetora e portanto gera uma maior intensidade de lesões e áreas hemorrágicas ocasionadas pelo etanol.

No grupo tratado com omeprazol foi evidenciado extensa área de preservação do epitélio foveolar (Figura 3.b1). As glândulas fúndicas mostraram-se bem definidas (Figura 3.b2) e as células parietais e principais compatíveis com a normalidade (Figura 3.b3). Em suma, a análise desse grupo demonstrou um epitélio bem preservado com raras áreas focais de hiperemia e presença de ocasionais linfócitos da lâmina própria. O omeprazol é um fármaco muito utilizado como gastroprotetor, pois atua inibindo a bomba de prótons, e conseqüentemente a secreção de ácido clorídrico (GUIMARÃES *et al.*, 2006).

Quando tratados com omeprazol, os espécimes estudados demonstraram diferença significativa se comparado ao grupo salina ($p=0,0008$), porém não foi evidenciado alteração com significância estatística no ILU em relação aos demais grupos ($p>0,05$).

Apesar do grupo tratado com cimetidina apresentar uma mucosa gástrica mais preservada que o grupo controle (salina), na análise foi evidenciado múltiplas áreas de exulceração secundárias à necrose fibrinóide da superfície epitelial (Figura 3.d1 e 3.d2), associado a uma intensa hiperemia entre as glândulas fúndicas (Figura 3.d2) e moderada infiltração leucocitária mononuclear na lâmina própria, em conjunto com focos de hemorrágicos (Figura 3.d2). Pode-se perceber também que mesmo nas áreas menos afetadas pelo etanol o epitélio foveolar se apresentou substituído por reação de granulação (Figura 3.d3). No entanto, as porções profundas se mostraram bem preservadas, embora já fosse possível verificar acúmulo leve de células inflamatórias crônicas na lâmina própria.

Os resultados dos histomorfológicos do grupo com extrato de caju levam a crer que o seu potencial gastroprotetor é inferior ao da mangaba, da cimetidina e do omeprazol, haja vista que alterações histomorfológicas foram mais marcantes neste grupo em comparação aos demais citados.

Os vegetais testados possuem potencial citoprotetor, embora inferior aos fármacos adotados na terapia, porém os resultados indicam que podem ser utilizados potencialmente como

adjuvantes na terapia antiúlcera, uma vez que podem ser consumidos diariamente e são bem aceitos pela população em geral na forma de sucos.

3.4 CONCLUSÃO

O presente estudo permite concluir que apesar dos extratos hidroetanólicos de mangaba e caju não apresentarem ação anti HP nas concentrações testadas, os mesmos demonstraram potencial gastroprotetor possivelmente devido aos flavonóides presentes que apresentaram atividade antioxidante.

REFERÊNCIAS

- ADELMANN, J. **Própolis**: Variabilidade Composicional, correlação com a flora e bioatividade antimicrobiana/antioxidante. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2005.
- ASSUNÇÃO, R.B.; MERCADANTE, A.Z. Carotenoids and ascorbic acid from cashew apple (*Anacardium occidentale* L.): variety and geographic effects. **Food Chemistry**. 81 495–502, 2003.
- BARCELOS, G.R.M.; SHIMABUKURO F.; MACIEL M.A.; COLUS, I.M.S. **Genotoxicity and antigenotoxicity of cashew (*Anacardium occidentale* L.) in V79 cells**. Toxicology in Vitro. v. 21, p 1468–1475, 2007.
- BARROS, M.P.; LEMOS, M.; MAISTRO, E. L.; LEITE, M. F.; SOUSA, J. P. B.; BASTOS, J. K.; ANDRADE, S. F. Evaluation of antiulcer activity of the main phenolic acids found in Brazilian Green Propolis. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 120, p. 372–377, 2008.
- BRITO, E.S.; ARAUJO, M.C.P.; HARNLY, J. **Determination of the flavonoid components of cashew apple (*Anacardium occidentale*) by LC-DAD-ESI/MS**. Food Chemistry, 105, 1112–1118, 2007.
- CANIZARES, P.; GRACIA, I.; GOMEZ, L. A.; ARGILA, C. M.; BOIXEDA, D.; GARCIA, A.; RAFAEL, L. Allyl-thiosulfinates, the Bacteriostatic Compounds of Garlic against *Helicobacter pylori*. **Biotechnol. Prog.** v. 20. n. 1. 2004.
- FERREIRA A L. **Atividade Antiulcerogênica da espécie *Anacardium humile* St. Hil. (*Anacardiaceae*)**. Tese 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.
- GUIMARÃES, E. V.; MARGUET, C.; CAMARGOS, P. A. M. Tratamento da doença do refluxo gastroesofágico, **Jornal de Pediatria**. 82(5), p. s133-s145 2006.
- JUNG, H.; NAM, J.; Choi, J.; LEE, K.; PARK, H., 19-Hydroxyursane-type triterpenoids: antinociceptive anti-inflammatory principles of the roots of *Rosa rugosa*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**. 28, 101–104, 2005.
- KUBO, J.; LEE, J. R.; KUBO, I. Anti-*Helicobacter pylori* Agents from the Cashew Apple. **J. Agric. Food Chem.** 47, 533-537, 1999.
- KUBO I.; MASUOKA N.; HA, T J Tsujimoto. K. Antioxidant activity of anacardic acids. **Food Chemistry**. 99 555–562, 2006.
- LAURENS, A.; MBOUP, S; GIONO, A.; BARBER, P.; DAVID-PRINCE, M. **Étude de l'action antibatérienne d'extraits d'*Anacardium occidentale* L.** *Ann Pharm Fr* 40: 143-146, 1992.
- MORAES T. M.; RODRIGUES C.M.; KUSHIMA, H.; BAUABC T. M.; VILLEGASB, W.; PELLIZZON C.H.; BRITO A.R.M.S.; HIRUMA-LIMA C.A. *Hancornia speciosa*: Indications of

gastroprotective, healing and anti-*Helicobacter pylori* actions. **Journal of Ethnopharmacology**. 120, 161–168, 2008.

MORENO, M. I. N.; ISLA, M. I.; SAMPIETRO, A. R.; VATTUONE, M. A. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 71, p. 109-114, 2000.

NOGUEIRA P. C. L.; SAMPAIO T. S. ***Volatile components of mangaba fruit (Hancornia speciosa Gomes) at three stages of maturity***. Food Chemistry, 2006.

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

OCHI, T.; SHIBATA, H.; HIGUTI, T.; KODAMA, K.; KUSUMI, T.; TAKAISHI, Y. *Anti-Helicobacter pylori Compounds from Santalum álbum*. **Journal of Natural Products**. v. 68. n. 6, 2005.

OLIVEIRA, I.G.; CARTAXO, S.L.; SILVA, M.A.P.S. Plantas Medicinais Utilizadas na Farmacopéia Popularem Crato, Juazeiro e Barbalha (Ceará, Brasil). **Revista Brasileira de Biociências**. Porto Alegre, v. 5, supl. 1, p. 189-191, jul. 2007.

ROCHA, G. R.; STEIN, R.; GUIMARÃES, M.R.; RIBEIRO, J. P. Resposta cronotrópica ao teste cardiopulmonar após o uso de cimetidina. **Arq. bras. cardiol.** 86(3):206-210, 2006.

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

TREVISAN, M.T.; PFUNDSTEIN, B.; HAUBNER, R.; WURTELE, G.; SPIEGELHALDER, B.; BARTSCH, H.; OWEN, R.W. Characterization of alkyl phenols in cashew (*Anacardium occidentale*) products and assay of their antioxidant capacity. **Food and Chemical Toxicology**. 44, 188–197, 2006.

VONKEMAN, H.E.; KLOK, R.M.; POSTMA, M.J.; BROUWERS, J.R.; VAN DE LAAR, M.A. ***Direct medical costs of serious gastrointestinal ulcers among users of NSAIDs***. **Drugs Aging** 24, 681–690, 2007.

WITTSCHIER, N.; LENGSELD, C.; VORTHEMS, S.; STRATMANN, U.; ERNST, J.F.; VERSPOHL, E.J.; HENSEL, A. Large molecules as anti-adhesive compounds against pathogens. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. 59, 777–786, 2007.

CONCLUSÃO FINAL

O presente estudo permite concluir que baseado nos protocolos terapêuticos atualmente propostos, a própolis vermelha demonstrou ser um importante gastroprotetor por possuir funcionalidade sobre etiologias exógenas (anti-Hp) e endógenas, visto que inibiu consideravelmente a formação de lesões gástricas provocados por etanol.

Os extratos hidroetanólicos de mangaba e caju também demonstraram inibição de lesões gástricas, principalmente a mangaba que obteve um desempenho similar ao da cimetina o que credencia este vegetal como potencial gastroprotetor.