



REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA – RENORBIO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO – UFMA

DÉBORA LUANA RIBEIRO PESSOA

ATIVIDADE GASTROPROTETORA DA GEOPRÓPOLIS DE *Melipona fasciculata* Smith (TIÚBA)

São Luís

2016

Débora Luana Ribeiro Pessoa

**Atividade gastroprotetora da geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith
(Tiúba)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia, Ponto Focal Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Marilene Oliveira da Rocha
Borges
Área de Concentração: Biotecnologia em Recursos
Naturais

São Luís
2016

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Pessoa, Débora Luana Ribeiro.

ATIVIDADE GASTROPROTETORA DA GEOPRÓPOLIS DE *Melipona fasciculata* Smith TIÚBA / Débora Luana Ribeiro Pessoa. - 2016.

186 f.

Orientador(a): Marilene Oliveira da Rocha Borges.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Biotecnologia - Renorbio/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2016.

1. Abelha sem ferrão. 2. Geoprópolis. 3. *Melipona fasciculata*. 4. Úlcera gástrica. I. Borges, Marilene Oliveira da Rocha. II. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO

Fundação Instituída nos Termos da Lei nº 5.152, de 21/10/1966 - São Luís - Maranhão

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA



rede nordeste de biotecnologia

Coordenação Geral - Universidade Federal Rural de Pernambuco

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n – Dois Irmãos – CEP: 52171-900 Recife-PE

Telefone (81) 3320-6050,3320-6051 E-mail: renorbio@prppg.ufrpe.br

Homepage: <http://www.renorbio.org.br>

FOLHA APROVAÇÃO DEFESA DE TESE

ALUNO: Débora Luana Ribeiro Pessoa

TÍTULO DO PROJETO: “ATIVIDADE GASTROPROTETORA DA GEOPRÓPOLIS de *Melipona fasciculata* Smith(TIÚBA)”.

PROFESSORA ORIENTADORA: Marilene Oliveira da Rocha Borges

BANCA EXAMINADORA:

CONCEITO

ASSINATURA

Prof^ª. Dr^ª. Marilene Oliveira da Rocha Borges – UFMA
(Presidente)

Prof. Dr. Ferdinan Almeida Melo – UEMA
(Titular)

Prof^ª. Dr^ª. Selma do Nascimento Silva – UFMA
(Titular)

Prof^ª. Dr^ª Rachel Melo Ribeiro - UFMA
(Titular)

Prof^ª. Dr^ª. Germana Freire Rocha Caldas – UFMA
(Titular)

DATA DA APROVAÇÃO: 29 de julho de 2016

HORÁRIO: Às 08:00h.

LOCAL: Prédio de Pós-Graduação do CCBS, Cidade Universitária Dom Delgado, UFMA.

“As nuvens mudam sempre de posição, mas são sempre nuvens no céu. Assim devemos ser todo dia, mutantes, porém leais com o que pensamos e sonhamos. Lembre-se: tudo se desmancha no ar, menos os pensamentos.”

Paulo Beleki

Dedico este trabalho aos meus pais, José de Ribamar Pessoa Filho "*in memoriam*" e Maria de Fátima Ribeiro Pessoa, pelo exemplo de dedicação, integridade e amor.

AGRADECIMENTOS

A Deus, Senhor da minha vida!

À minha família pelo apoio incondicional, especialmente à minha mãe Fátima presente em todos os momentos.

À Profa. Dra. Marilene Oliveira da Rocha Borges pela orientação, confiança e incentivo para realização do doutorado e seguimento à carreira acadêmica.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Romão Borges pela oportunidade na realização do doutorado.

À Profa. Dra. Maria do Socorro de Sousa Cartágenes pela primeira oportunidade no ingresso na pesquisa científica e pela sincera amizade ao longo desses anos.

Ao Prof. Me. João de Jesus de Oliveira Junior, pelo auxílio na formatação das imagens utilizadas neste trabalho.

À querida amiga Michelle Fonseca Coelho, pela revisão ortográfica e normalização deste trabalho.

Às Profas. Dras. Ana Lúcia Abreu-Silva, Denise Fernandes Coutinho Moraes e Germana Freire Rocha Caldas pelas sugestões no exame de Qualificação.

À equipe do DAPI - UFMA pelo acompanhamento, com competência e disponibilidade, em todas as etapas da patente, da escrita ao depósito.

Aos colegas professores do Campus Pinheiro - UFMA, pelo apoio no decorrer do doutorado, em especial Profa. Ma. Mayara Cristina Pinto da Silva, Profa. Ma. Anne Karine Martins Assunção, Prof. Me. João de Deus Cabral Junior, Profa. Esp. Michelline Joana T.A.M. Mesquita e Prof. Me. Wermerson Assunção Barroso.

Aos funcionários do Biotério pelo fornecimento dos animais solicitados, informações técnicas e acompanhamento, quando necessário.

Aos colegas de curso Ahirlan Silva de Castro, Bismarck Ascar Sauaia e Izabel Cristina Portela Bogéa Serra pela amizade, companheirismo e ótima convivência que acompanharam o nosso curso.

Aos colegas professores e gestores de instituições de ensino onde desenvolvi as minhas atividades profissionais anteriores ao ingresso na UFMA, e que me deram todo o apoio necessário para a realização das atividades iniciais do doutorado, em especial os professores Hermínio de Sousa Lima, Kardene Pereira Rodrigues, Conceição de Maria Moura Ferreira e Flávia Helena Cabral.

Aos colegas do Laboratório de Pesquisa e Pós-graduação em Farmacologia que compartilham desde a iniciação científica da amizade, além de boas conversas, Profas. Dra. Selma do Nascimento Silva, Dra. Rachel Melo Ribeiro, Dra. Iracelle Carvalho Abreu, Dra. Aline Amorim e com carinho Sras. Rosa e Josenildes.

Aos alunos de IC – Ramylia, Érika, Antônio Luís, Rafaela e Thalita e à Mestre Ana Kely Araújo pela colaboração nos experimentos.

Aos técnicos Elaine Mendes e Denílson Amorim, por todo auxílio que me prestaram no laboratório.

A todos que compõem o Laboratório de Pesquisa e Pós-graduação em Farmacologia, alunos de IC, mestrandos, doutorandos, professores, técnicos que formam a nossa família científica, meus sinceros agradecimentos.

Ao Laboratório de Farmacognosia – DAFAR/UFMA pelo fornecimento das amostras da geoprópolis para execução dos experimentos.

Ao CNPq, CAPES e FAPEMA pelo auxílio financeiro ao projeto.

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

%	Por cento ou percentual
µL	Microlitro(s)
µm	Micrômetro (s)
ACh	Acetilcolina
AINEs	Anti-inflamatórios não - esteroidais
AL	Alagoas
BA	Bahia
CCK	Colecistoquinina
CE	Ceará
CO₂	Dióxido de carbono
COX	Ciclooxigenase
CRF	Corticotrofina
DCV	Complexo dorsal vagal
DMN	Núcleo motor dorsal vago
ECL	Células do tipo eletrocromafins
EHG	Extrato hidroalcoólico liofilizado da geoprópolis de <i>Melipona fasciculata</i> Smith
FD	Dispepsia funcional
GSH	Glutathiona reduzida
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
H⁺-K⁺-ATPase	Bomba de prótons ou sódio-potássio
HCl	Ácido clorídrico
HE	Hematoxilina/eosina
HPLC-DAD-MS	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector "Diode Array"
i.c	Via intracisternal
i.p	Via intraperitoneal
IBP	Inibidor da bomba de prótons
IP₃	Inositol trifosfato
Ki-67	Antígeno marcador de proliferação celular Ki-67
L-NAME	L-N ^G -Nitroarginina Metil Ester

M	Molar
<i>M. fasciculata</i>	<i>Melipona fasciculata</i>
MA	Maranhão
mEq/L	Miliequivalente(s) por litro
mg	Miligrama(s)
mg/Kg	Miligrama(s) por quilograma
mm²	Milímetro(s) quadrado(s)
NaCl	Cloreto de Sódio
NEM	N-Etilmaleimida
NO	Óxido nítrico
nm	Nanômetro(s)
NTS	Núcleo do trato solitário
p/v	Peso/volume
PAS	Ácido periódico de Schiff
PB	Paraíba
PE	Pernambuco
PG	Prostaglandina
pH	Potencial de íons hidrogênio ou hidrogeniônico
PI	Piauí
REB	Ritmo elétrico básico do estômago
RN	Rio Grande do Norte
RNA_m	RNA mensageiro
SE	Sergipe
-SH	Grupamentos sulfidrílicos
SNA	Sistema nervoso autônomo
SNC	Sistema nervoso central
v.o	Via oral
VacA	Vacuolização de citotoxina A

LISTA DE TABELAS E QUADROS

REVISÃO DE LITERATURA

Quadro 1:	Fatores que regulam a motilidade e o esvaziamento gástrico ...	24
Quadro 2:	Características da Mucosa estomacal e glândulas gástricas	25
Quadro 3:	Causas de úlcera péptica	32
Quadro 4:	Esquemas de tratamento para erradicação de <i>Helicobacter pylori</i> na úlcera péptica	39
Quadro 5:	Principais espécies de abelhas produtoras criadas na região nordeste do Brasil	41
Quadro 6:	Atividades biológicas da própolis e geoprópolis, em estudos publicados de 2006 a 2016	43

CAPÍTULO I

Table 1:	Effects of the hydroalcoholic extract of the geopropolis of <i>Melipona fasciculata</i> Smith (EHG) in ethanol-induced ulcers in mice	74
Table 2:	Effects of the hydroalcoholic extract of the geopropolis of <i>Melipona fasciculata</i> Smith (EHG) in indomethacin-induced ulcers in mice	74
Table 3:	Effects of the hydroalcoholic extract of the geopropolis of <i>Melipona fasciculata</i> (EHG) on the gastric juice parameters of rats after pylorus ligation	75

CAPÍTULO II

Table 1:	Effect of the hydroalcoholic extract of geopropolis (EHG) from <i>Melipona fasciculata</i> Smith on the gastric mucus.....	101
Table 2:	Involvement of sulfhydryl groups (–SH groups) on the gastroprotective effect of EHG from <i>Melipona fasciculata</i> Smith in ethanol-induced gastric ulcer.....	101
Table 3:	Involvement of nitric oxide (NO) on the gastroprotective effect of EHG from <i>Melipona fasciculata</i> Smith in ethanol-induced chronic ulcer.....	102

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1: Ação de *Helicobacter pilory* na mucosa gástrica33
- Figura 2: Interações propostas entre hospedeiro e *Helicobacter pylori* no desenvolvimento de lesões gastroduodenais 34

CAPÍTULO I

- Figure 1: Photomicrograph of the stomachs of Swiss mice that received ethanol as pathogenic agent.....75
- Figure 2: Effect of hydroalcoholic extract of the geopropolis of *Melipona fasciculata* (EHG) on gastric emptying after 20 min ingestion of the marker.....76
- Figure 3: Effect of hydroalcoholic extract of the geopropolis of *Melipona fasciculata* (EHG) on intestinal transit after 20 min ingestion of the marker.....76

CAPÍTULO II

- Figure 1: Effect of EHG on levels of sulfhydryl groups in the gastric ulcers model induced by ethanol.103
- Figure 2: EHG effect on 30% acetic acid-induced gastric ulcer in rats.....104
- Figure 3: Macroscopical appearance of the gastric ulcer and photomicrographs of gastric mucosa stained with HE and PAS of the rats subjected to induction of chronic ulcer by 30% acetic acid105
- Figure 4: Immunohistochemical analysis for COX-2 and Ki-67 of the gastric mucosa of the rats subjected to induction of chronic ulcer by 30% acetic acid106

RESUMO

A geoprópolis é um produto obtido a partir da mistura de resinas de plantas coletadas por abelhas, acrescida de cera, terra ou barro. A geoprópolis produzida por *Melipona fasciculata* Smith, conhecida como tiúba, é tradicionalmente utilizada em processos inflamatórios, gastrite, neoplasias, hemorróidas, afecções do sistema respiratório e ainda, como cicatrizante. Apresenta em sua composição química, predominantemente, ácidos fenólicos, triterpenos e taninos hidrolizáveis. Este estudo teve como objetivo, avaliar a atividade antiulcerogênica e gastroprotetora do extrato hidroalcoólico liofilizado da geoprópolis de *Melipona fasciculata* (EHG), proveniente do cerrado Maranhense. A geoprópolis foi coletada em um meliponário na cidade de Fernando Falcão, Maranhão, Brasil. O EHG foi obtido por maceração em uma solução hidroalcoólica a 70%. No modelo de indução de úlcera por etanol a 75%, o tratamento de camundongos com EHG, 50 ou 100 mg / kg, reduziu a área ulcerada em 66,6% e 93,2%, respectivamente, quando comparado com o grupo controle ($127,7 \pm 9,5 \text{ mm}^2$). Na indução de úlcera por indometacina, o tratamento dos camundongos com EHG nas mesmas doses, reduziu a área ulcerada em 82,9% e 92,5%, respectivamente, em relação ao grupo controle ($119,3 \pm 24,2 \text{ mm}^2$). A análise histopatológica dos estômagos de animais tratados com EHG não revelou nenhuma lesão aguda do epitélio, quando comparado com o grupo controle, que revelou uma redução na integridade epitelial. Na avaliação da secreção gástrica, em ratos, o extrato (100 e 200 mg/Kg) induziu ao aumento da acidez total, reduziu o volume da secreção na maior dose e, não alterou o pH, nas duas doses avaliadas. O EHG nas doses de 100 e 200 mg/Kg não alterou o esvaziamento gástrico, mas diminuiu o trânsito intestinal de ratos, de forma dependente de dose. O tratamento com o EHG induziu aumento ($p < 0,05$) na produção de muco gástrico ($236,7 \pm 10,4 \mu\text{g}$ de Alcian blue/ g de tecido glandular, 100 mg / kg). Em camundongos pré-tratados com N-etilmaleimida (NEM), um inibidor de compostos sulfidrílicos, a atividade gastroprotetora do EHG, foi reduzida para 34,54%, enquanto que o pré-tratamento com salina mostrou uma proteção maior, de 56,4%. Além disso, o tratamento oral com EHG aumentou para $18,0 \mu\text{g/g}$ de tecido, os níveis de grupos sulfidrílicos da mucosa gástrica, após lesão induzida pelo etanol ($4,9 \pm 1,0 \mu\text{g/g}$ de tecido). Por outro lado, o pré-tratamento com N^G nitro-L-arginina (L-NAME), um inibidor da síntese de NO, não influenciou a atividade gastroprotetora do extrato. EHG reduziu as lesões de úlcera, induzida de forma crônica pelo ácido acético, em 59%. Na análise histopatológica, o tecido da mucosa gástrica de ratos tratados com EHG mostrou-se organizado, com fibrose consolidada e diminuição da inflamação. Neste grupo, a marcação com PAS tornou-se mais intensa, com difusa marcação epitelial. A investigação imunohistoquímica mostrou intensa reatividade para COX -2 e baixa reatividade para Ki -67, na mucosa gástrica dos animais tratados EHG. Em conjunto, os resultados sugerem que EHG de *M. fasciculata* apresenta efeito antiulcerogênico observados nos modelos de indução de úlcera gástrica aguda e crônica e, que a ação gastroprotetora do EHG provavelmente envolve a participação de compostos sulfidrílicos (-SH) não protéicos. Estes efeitos podem estar relacionados aos compostos fenólicos presentes na geoprópolis do município de Fernando Falcão.

Palavras-chave: Úlcera gástrica. *Melipona fasciculata*. Abelha sem ferrão. Geoprópolis.

ABSTRACT

Geopropolis is a product obtained from the mixture of plant resins collected by bees plus wax, earth or clay. Geopropolis produced by *Melipona fasciculata* Smith, known as tiúba is traditionally used in inflammatory processes, gastritis, cancer, hemorrhoids, respiratory system disorders, and also as wound healing. It presents in its chemical composition predominantly phenolic acids, triterpenes and hydrolysable tannins. This study aimed to evaluate the anti-ulcer activity and gastroprotective lyophilized hydroalcoholic extract geopropolis of (EHG), from the Maranhense cerrado. The geopropolis was collected in a meliponary in the city of Fernando Falcão, Maranhão, Brazil. The EHG was obtained by maceration in a water-alcohol solution 70%. In the model ethanol ulcer induction than 75%, treatment of mice with EHG, 50 or 100 mg / kg reduced the ulcerous area of 66.6% and 93.2%, respectively, compared with the control group ($127.7 \pm 9.5 \text{ mm}^2$). In indomethacin ulcer induction, treatment of mice with EHG the same doses, reduced the ulcerated area in 82.9% and 92.5%, respectively, compared to the control group ($119.3 \pm 24.2 \text{ mm}^2$). Histopathological analysis of the stomachs of animals treated with EHG revealed no acute injury of the epithelium when compared with the control group, which revealed a reduction in epithelial integrity. In evaluating the gastric secretion in rats, the extract (100 and 200 mg/kg) induced an increase in total acidity, reduced the volume of secretion in higher dose, and did not alter the pH, the two doses evaluated. The EHG at doses of 100 and 200 mg / kg did not alter gastric emptying, but decreased intestinal transit of rats in dose-dependent manner. Treatment with EHG induced increase ($p < 0.05$) in the production of gastric mucus ($236.7 \pm 10.4 \mu\text{g}$ of Alcian blue/ g glandular tissue, 100 mg / kg). In mice pretreated with N-ethylmaleimide (NEM), an inhibitor of sulfhydryl compounds, the gastroprotective activity of EHG was reduced to 34.54%, whereas pre-treatment with saline showed a higher protection 56.4 %. Moreover, oral treatment with EHG increased to 18.0 g/ g tissue levels of sulfhydryl groups of the gastric mucosa from injury induced by ethanol ($4.9 \pm 1.0 \text{ mg / g tissue}$). Furthermore, pre-treatment with N^G-nitro-L-arginine (L-NAME), an inhibitor of NO synthesis, did not affect the gastroprotective activity of the extract. EHG reduced the ulcer lesions induced chronically by acetic acid in 59%. Histological analysis of the tissue gastric mucosa of rats treated with EHG proved arranged with consolidated fibrosis and decreased inflammation. In this group, staining with PAS has become more intense, with diffuse epithelial marking. The immunohistochemical study showed intense reactivity for COX -2 and low reactivity to Ki-67, the gastric mucosa of animals treated EHG. Taken together, the results suggest that EHG *M. fasciculata* has antiulcerogenic effect observed in models of acute gastric ulcer induction and chronic and that the gastroprotective action of EHG probably involves the participation of sulfhydryl compounds (-SH) no protein. These effects may be related to the phenolic compounds present in geopropolis the city of Fernando Falcao.

Keywords: Gastric ulcer. *Melipona fasciculata*. Stingless bee. Geopropolis.

SUMÁRIO

	APRESENTAÇÃO	16
1.	INTRODUÇÃO	18
2.	REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1.	Fisiologia Gástrica: Motilidade e secreção gástricas	22
2.2.	Fatores de agressão e proteção da mucosa gástrica.....	29
2.3.	Úlcera péptica.....	32
2.4.	Tratamento Farmacológico da Úlcera Péptica.....	36
2.5.	Própolis e Geopropolis.....	40
3.	JUSTIFICATIVA	49
4.	OBJETIVOS	51
5.	CAPÍTULO I Artigo a ser submetido: “Antiulcerogenic Activity of the Geopropolis of <i>Melipona fasciculata</i> Smith”	53
6.	CAPÍTULO II Artigo a ser submetido: “Gastroprotective mechanisms of action of geopropolis from <i>Melipona fasciculata</i> Smith”	78
7.	CAPÍTULO III Patente depositada: “COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS PARA DISTÚRBIOS GÁSTRICOS A BASE DE GEOPRÓPOLIS”.....	108
8.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	112
	REFERÊNCIAS	114
	APÊNDICES	129
	ANEXOS	135

Apresentação

APRESENTAÇÃO

A presente tese trata da atividade gastroprotetora da geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith, conhecida popularmente como “Tiúba”.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antiulcerogênica e gastroprotetora do extrato hidroalcoólico liofilizado da geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith (tiúba) (EHG), do cerrado maranhense.

A tese está organizada em revisão de literatura e três capítulos. Na revisão de literatura são abordados aspectos relacionados à fisiologia gástrica (motilidade e secreção gástricas), fatores de agressão e proteção da mucosa gástrica, úlcera péptica, tratamento farmacológico da úlcera péptica, própolis e geoprópolis.

No capítulo I encontram-se os dados no formato de artigo científico intitulado “Antiulcerogenic Activity of the Geopropolis of *Melipona fasciculata* Smith”, a ser submetido ao periódico “European Journal of Pharmacology”.

No capítulo II, o artigo intitulado “Gastroprotective mechanisms of action of geopropolis from *Melipona fasciculata* Smith”, a ser submetido ao periódico “Journal of Ethnopharmacology”.

Por fim, no capítulo III o resumo e as reivindicações da patente depositada intitulada “Composições farmacêuticas para distúrbios gástricos a base de geoprópolis”

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A úlcera péptica é um agravo provocado por diversos fatores e que apresenta sintomatologia ligada aos reflexos orgânicos que incluem dores estomacais, náuseas e hemorragia gástrica (INEU et al., 2008). Esse tipo de lesão leva à necrose que acomete toda a superfície da mucosa gástrica e também a camada muscular (ALIMI et al., 2010). 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 anti-inflamatórias não-esteroidais (AINEs), ingestão de determinados alimentos, infecção por *Helicobacter pylori* e predisposição genética podem atuar conjuntamente reduzindo os mecanismos de defesa da mucosa gástrica (WOLFE e SANCHES, 2000; O'MALLEY, 2003).

No Brasil, o consumo de medicamentos para o tratamento de úlceras gástricas é significativo, e os recursos naturais no Brasil são inúmeros, bem como os relatos de ação farmacológica das plantas existentes. Dentre os produtos naturais com potencial biológico utilizado popularmente contra úlcera e gastrite, encontram-se a própolis e seus derivados (ARRAIS, 1997).

A própolis tem sido utilizada extensivamente desde os tempos antigos. Seu uso popular é amplo e está disponível em estado puro ou combinado com outros produtos naturais em medicamentos, cosméticos e como componente de alimentos saudáveis. Nas últimas décadas, muitos estudos científicos têm sido realizados a fim de investigar seus constituintes e comprovar suas propriedades biológicas (SFORCIN e BANKOVA, 2011). As atividades hipolipemiante (KOLANKAYA et al, 2002), antimicrobiana, anti-inflamatória (MARCUCCI et al, 2001), anticariogênica (KOO et al, 2000, DUARTE et al, 2006), anticarcinogênica e antioxidante (CHEN et al, 2003; NAGAI et al, 2003; ASO et al, 2004; ISHIKAWA et al, 2004; KUMAZAWA et al., 2004) têm sido descritas, no entanto, a composição química e as atividades

biológicas de própolis e seus derivados variam de acordo com o local de origem (KUMAZAWA et al., 2004).

As análises da composição química da própolis identificaram pelo menos 300 compostos (CASTRO, 2001; ALENCAR et al., 2007). As atividades biológicas da própolis são atribuídas principalmente aos componentes fenólicos tais como flavonoides (YANG et al., 2014). Os flavonóides têm sido reportados por apresentarem uma ampla gama de atividades, incluindo antibacteriana (CUSHNIE e LAMB, 2011), antiviral (KANG et al., 2012), anti-inflamatória (SALEEM et al., 2011) e vasodilatadora (RODRÍGUEZ-RAMOS et al., 2013). Além disso, os flavonóides inibem a peroxidação lipídica, a agregação plaquetária, a permeabilidade capilar, a fragilidade osmótica, e a atividade de sistemas enzimáticos, incluindo ciclo-oxigenase e lipoxigenase (HAVSTEEN, 2002; MOREIRA et al., 2008).

O estado do Maranhão apresenta um grande potencial apícola e meliponícula mas, pesquisas científicas relacionadas aos temas são incipientes, o que justifica o estudo das características farmacológicas da geoprópolis maranhense (DUTRA et al., 2008).

Os meliponíneos são encontrados em regiões tropicais e sub-tropicais, até 30º de latitude norte e sul. Estas abelhas têm a característica peculiar de apresentarem o ferrão atrofiado, por isso são conhecidas como abelhas sem ferrão ou "stingless bees" (PRONI e MACIEIRA, 2004).

Dentre as abelhas sem ferrão existentes no Brasil, destacam-se aquelas pertencentes à família Apidae e subfamília Meliponinae. Estas abelhas misturam o material resinoso que coletam das plantas, com cera e terra, formando a geoprópolis (CASTALDO e CAPASSO, 2002; ARAÚJO et al., 2010).

Amostras da geoprópolis, produzida pela abelha da espécie *Melipona fasciculata* Smith, conhecida pela população como tiúba, originada da região do cerrado maranhense, tem cheiro, odor e sabor característico, e são ricas em

substâncias químicas das classes dos compostos fenólicos e dos triterpenos (NOGUEIRA et al, 2004). Gomes et al. (2003) mostraram as atividades antiinflamatória e analgésica do extrato hidroalcoólico de geoprópolis da tíuba. Duailibe (2004) observou em seu estudo que o uso de bochecho da solução do extrato alcoólico da geoprópolis da tíuba diminuiu o número de colônias de *Streptococcus mutans* na saliva dos pacientes. Dutra et al. (2008) identificaram altas concentrações de flavonoides na geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith, podendo, estes componentes apresentarem estreita relação com as atividades biológicas já relatadas.

Em relação à atividade da geoprópolis no trato digestivo, apenas o trabalho de Ribeiro-Júnior et al. (2015), relata que a geoprópolis produzida pela abelha da espécie *Melipona scuterallis*, originada da Bahia, apresenta efeito gastroprotetor. Os autores propuseram que esta atividade envolve a produção de óxido nítrico e prostaglandinas, que são fatores protetores da mucosa gástrica.

Portanto, considerando que no estado do Maranhão os produtos obtidos de *Melipona fasciculata* Smith, conhecida como tíuba, são utilizados tradicionalmente no tratamento de doenças do trato gastrointestinal, e que a literatura não refere estudos que comprovem a atividade da geoprópolis desta abelha nestas patologias, o presente trabalho propõe avaliar o efeito gastroprotetor do extrato hidroalcoólico da geoprópolis da tíuba, a fim de contribuir para a validação de suas propriedades medicinais.

Revisão de Literatura

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fisiologia Gástrica: Motilidade e secreção gástricas

A motilidade gástrica é complexa e sujeita a diversos impulsos reguladores. As quatro etapas da motilidade gástrica são: enchimento, armazenamento, mistura e esvaziamento (SCHUBERT, 2005).

O estômago vazio pode acomodar uma mudança de 20 vezes no volume sem alteração significativa em suas paredes, pois em seu interior existem dobras profundas. Tais dobras adaptam-se à medida que o estômago é preenchido. Este relaxamento reflexo presente no estômago quando o mesmo recebe alimento é denominado relaxamento receptivo. Tal fenômeno tem como finalidade aumentar a capacidade estomacal de acomodar o alimento, com pouco aumento da pressão. O relaxamento receptivo é ativado pelo ato de comer e mediado pelo nervo vago (SOYBEL, 2005).

Um grupo de células marca-passo (células intersticiais de Cajal) localizado na região superior do fundo do estômago gera potenciais de onda lenta que percorrem o estômago em direção ao esfíncter pilórico. Este padrão sucessivo de despolarizações espontâneas – ou ritmo elétrico básico do estômago (REB) ocorre continuamente e pode ou não ser acompanhada pela camada muscular lisa do estômago. A onda peristáltica se propaga pelo fundo e pelo corpo até o antro e o esfíncter pilórico. Em função da variação de camadas musculares nas diferentes regiões do estômago, no fundo e no corpo as contrações peristálticas são fracas, enquanto no antro as contrações são mais fortes e vigorosas (SOYBEL, 2005; ZHANG et al, 2016).

As fortes contrações peristálticas do antro misturam o alimento com a secreção gástrica para produzir o quimo, e o direciona ao esfíncter pilórico. (SOYBEL, 2005; GRONEBERG et al., 2015).

Além de misturar o conteúdo gástrico, as contrações peristálticas do antro também são as forças de impulsão para o esvaziamento gástrico. A intensidade do peristaltismo no antro pode variar notavelmente sobre a influência de diferentes sinais do estômago e do duodeno (Quadro 1). Esses fatores influenciam a excitabilidade do estômago, que, por sua vez, é um determinante da atividade peristáltica do antro. Quanto maior a atividade peristáltica no antro, mais rápida a taxa de esvaziamento gástrico (LAMMERS, 2015; GYAWALI e PATEL, 2014; BESANKO et al, 2014).

Quadro 1: Fatores que regulam a motilidade e o esvaziamento gástrico

Fatores	Modo de Regulação	Efeitos sobre a mobilidade e o esvaziamento gástrico
Dentro do estômago		
Volume de Quimo	A distensão tem um efeito direto sobre a excitabilidade do músculo liso gástrico, além de atuar por meio dos plexos intrínsecos, do nervo vago e da gastrina.	O maior volume estimula a mobilidade e o esvaziamento.
Grau de Fluidez	Efeito direto; o conteúdo deve estar em forma fluida para ser evacuado.	Maior fluidez permite o esvaziamento mais rápido.
Dentro do duodeno		
Presença de gordura, ácido, hipertonicidade ou distensão	Inicia o reflexo enterogástrico ou ativa a liberação de enterogastronas (secretina, colecistoquinina).	Esses fatores no duodeno inibem maior motilidade gástrica e esvaziamento até que o duodeno tenha lidado com fatores já presentes.
Fora do sistema digestório		
Emoção	Altera o equilíbrio autonômico	Estimula ou inibe a mobilidade e o esvaziamento.
Dor intensa	Aumenta a atividade simpática	Inibe a motilidade e o esvaziamento.

Adaptado: SHERWOOD, 2011.

A superfície da mucosa gástrica é recoberta pelas células epiteliais colunares que secretam muco que protege o epitélio da lesão mecânica e do ácido gástrico (SILVA, 2010).

Funcionalmente, a mucosa gástrica possui a área glandular, constituída de vários tipos celulares (Quadro 2). A porção glandular oxíntica compreende as células parietais secretoras de ácido clorídrico, localizadas no fundo e corpo, células principais (produtoras de pepsinogênio), células produtoras de somatostatina (células D), células do tipo enterocromafins (ECL) que liberam histamina e células produtoras de muco. A porção glandular pilórica apresenta os mesmos tipos celulares que as glândulas oxínticas, excetuando as células principais e incluem as células G, produtoras de gastrina (JAIN et al., 2007).

Quadro 2: Características da Mucosa estomacal e glândulas gástricas

Tipo de célula secretória	Produto secretado	Estímulos para secreção	Funções do produto secretado
Células exócrinas			
Células mucosas	Muco alcalino	Estimulação mecânica pelo conteúdo	Protege a mucosa contra ferimentos, da pepsina e do ácido
Células principais	Pepsinogênio	Acetilcolina (ACh), gastrina	Quando ativado, inicia a digestão de proteínas
Células parietais	Ácido clorídrico	ACh, gastrina, histamina	Ativa o pepsinogênio, decompõe tecido conjuntivo, desnatura proteínas, mata micro-organismos.
	Fator intrínseco		Facilita a absorção de vitamina B12
Células endócrinas/parácrinas			
Células do tipo eletrocromafins (ECL)	Histamina	ACh, gastrina	Estimula células parietais
Células G	Gastrina	Produtos protéicos, ACh	Estimula células parietais e ECL
Células D	Somatostatina	Ácido	Inibe células parietais, G e ECL

Adaptado: SHERWOOD, 2011

O suco gástrico é uma mistura das secreções das células epiteliais superficiais gástricas e das glândulas gástricas e compreende: ácido clorídrico (HCl), pepsinas, fator intrínseco, muco, bicarbonato, água e sais (STANTON e KOEPPEN, 2009). A regulação da secreção ácida gástrica é um processo complexo, o qual envolve mecanismos neurais, hormonais, parácrinos e autócrinos em níveis central e periférico os quais convergem para a etapa final da secreção de HCl (SCHUBERT, 2005; SCHUBERT, 2014).

Os principais estimulantes parácrinos, hormonais e neuronais da secreção ácida são, respectivamente: histamina, liberada das células ECL; gastrina, liberada das células G e acetilcolina (ACh), liberada dos neurônios pós-ganglionares entéricos. A principal substância inibidora da secreção de HCl é a somatostatina, liberada das células D oxínticas e pilóricas (mecanismo parácrino) (YAO; FORTE 2003).

2.1.1 Mecanismos Estimulantes e inibitórios da Secreção Gástrica

A taxa de secreção gástrica pode ser influenciada por fatores que surgem antes que o alimento chegue ao estômago, fatores resultantes da presença de alimento no estômago e fatores no duodeno depois que o alimento saiu do estômago, denominadas fases cefálica, gástrica e intestinal, respectivamente.

A fase cefálica da secreção gástrica corresponde à fase em que ocorre a maior secreção de HCl e pepsinogênio ativada em resposta a estímulos cerebrais. A estimulação vagal dos plexos intrínsecos promove maior secreção de ACh, o que leva à maior secreção de HCl pelas células secretórias. A estimulação vagal das células G causa liberação de gastrina, aumentando a secreção de HCl e promovendo a liberação de histamina (KERMANI & ELIASSI, 2012).

A fase gástrica da secreção gástrica é estimulada principalmente por proteínas, aumentando tal secreção ao sobrepor vias eferentes. A atividade vagal aumenta ainda mais a estimulação nervosa intrínseca das células secretórias e ativa

a liberação de gastrina. Esta, por sua vez, é um estímulo para maior secreção de HCl, pepsinogênio e histamina, o que aumenta ainda mais a secreção de HCl. Além das proteínas, a cafeína e o álcool estimulam a secreção de um suco gástrico altamente ácido (KONG et al., 2016).

A fase intestinal da secreção gástrica abrange os fatores que se originam no intestino delgado que influenciam a secreção gástrica. Enquanto as outras fases são excitatórias, esta fase é inibitória (HOLTMANN E TALLEY, 2014). A seguir serão detalhados os principais fatores estimulantes e inibitórios da secreção gástrica:

A gastrina, principalmente presentes nas células G do antro gástrico e também no duodeno, é sintetizada como um precursor de aminoácido, pré-progastrina que, através de peptidases e convertases, é processada para produzir gastrina. A gastrina é metabolizada principalmente pelo rim, no intestino e no fígado. Gastrina e Colecistoquinina (CCK) exercem as suas ações através de dois receptores acoplados à proteína G denominado CCK1 (termo antigo, CCKA) e CCK2 (termo antigo, CCKB) (KOVAC et al., 2010; WAKIN et al., 2013; DUPRE e TOSTIVINT,2014; SCHUBERT, 2014).

A gastrina estimula a secreção de ácido, principalmente pela ligação a receptores CCK2 nas células ECL, levando a secreção de histamina. Netazepida, um antagonista do receptor de gastrina (CCK2R), inibe a secreção de ácido em seres humanos, mas não ao nível da bomba de prótons (IBP) (HELGADOTTIR et al., 2014). A gastrina é não só um secretagogo, mas também um hormônio de apoptose pois interfere na divisão celular e inibição da promoção do crescimento. No estômago, a hipergastrinemia produzida por gastrinoma, ou gastrite atrófica induz hipertrofia e hiperplasia (MORTON et al., 2011; BOYCE & WARRINGTON, 2013).

Na região do corpo e fundo do estômago, a acetilcolina liberada dos neurônios colinérgicos estimula a secreção ácida por ação direta na célula parietal, através de receptores muscarínicos do tipo M₃, bem como indiretamente, pela eliminação do efeito inibitório que a somatostatina exerce tanto nas células parietais como nas células ECL (MÖSSNER e CACA, 2005). Os receptores M₃ são acoplados

a proteína G e induzem a ativação de fosfolipase C, com geração de inositol trifosfato (IP₃) e liberação de cálcio intracelular (YAMAZAKI et al., 2009).

A histamina é liberada pelas células ECL, estrutura endócrina importante na mucosa oxíntica, representando cerca de 30-50% das células do sistema endócrino em humanos. A histamina estimula a célula parietal diretamente através de receptores histaminérgicos do tipo H₂ (SCHUBERT, 2014). Além da histamina, as células ECL podem expressar cromogranina A, pancreastatina, grelina, adrenomedulina e somatostatina (LI et al., 2014).

No sistema nervoso central (SNC) o complexo dorsal vagal (DVC, incluindo o núcleo motor dorsal vago (DMN), núcleo do trato solitário (NTS) e o hipotálamo, tem proeminente papel na regulação das funções gastrointestinais e interligações entre o hipotálamo neuroendócrino e o Sistema Nervoso Autônomo (SNA) (TACHÉ, 2012; GYIRES e ZÁDORI, 2014).

A maioria das evidências sobre o envolvimento do SNC na regulação da integridade da mucosa gástrica veio de intervenções farmacológicas. Foram utilizados modelos de úlcera principalmente ácido-dependentes, como lesão da mucosa induzida pelo estresse, que foi inibida pela bombesina, neurotensina, β -endorfina, substância P ou somatostatina injetado na cisterna magna (via intracisternal, i.c.), ou de fator de liberação de corticotropina (CRF) na amígdala ou no ventrículo cerebral lateral. Outros peptídeos, tais como amilina, bombesina ou diferentes opióides (injetados via intracisternal) têm demonstrado ser eficazes no modelo de úlcera induzido por indometacina (TACHÉ, 2012; GYIRES e ZÁDORI, 2014).

A grelina, um peptídeo orexígeno que tem sido relatado como um estimulante da secreção ácida, por induzir a liberação de histamina a partir de células ECL, é expresso em células localizadas na porção basal das glândulas oxínticas. As concentrações de grelina são elevadas no estado de jejum e suprimida em resposta à ingestão de alimentos, obesidade, e a infecção por *Helicobacter pylori* (SZLACHIC et al., 2010; STEVANOVIC et al., 2014). Como a grelina possui propriedades gastroprotetoras e imunorreguladoras, a diminuição da síntese da grelina ou pela

infecção por *H. pylori* pode desempenhar um papel na manutenção da resposta inflamatória (GAHETE et al., 2014; RAU et al., 2014).

As orexinas são hormônios neuropeptídicos que são liberados a partir de uma pequena população de neurônios com projeções para várias outras áreas do cérebro. (BACCARI, 2010; SAKURAI et al., 2010; SAKURAI E MIEDA, 2011). Orexina e neuropeptídeo Y (NPY) são importantes candidatos como mediadores da resposta secretora da fase cefálica, para a alimentação. Alguns estudos descrevem que a administração central da orexina do tipo A estimula a secreção de ácido (ELIASSI et al., 2009, CHALEEK et al., 2012, KERMANI & ELIASSI, 2012).

2.2 Fatores de proteção e agressão da mucosa gástrica

A mucosa gástrica está constantemente exposta a numerosos fatores agressivos exógenos e endógenos. Porém, sob circunstâncias normais a mucosa gastroduodenal está protegida por seus próprios mecanismos de defesa (HUANG et al., 2016).

Como porta de entrada de diversos agentes no organismo, o estômago desenvolveu diversos mecanismos de proteção. Entre os principais estão os fatores secretados no lúmen, incluindo ácido, muco, bicarbonato e agentes antibacterianos, como as imunoglobulinas. Ainda que o ácido clorídrico tenha o potencial de causar injúria à mucosa gástrica, é importante lembrar que sua principal função é a proteção contra microorganismos ingeridos. Estes mecanismos, denominados citoprotetores, aumentam a resistência das células e limitam o acesso dos agentes agressores a elas. A defesa ou proteção da camada mucosa do estômago é constituída de muco e bicarbonato, cuja função principal é evitar o contato do ácido clorídrico com as células do epitélio (BIGHETTI et al., 2002).

O bicarbonato é secretado pelas células superficiais do estômago e pelo duodeno, em resposta a vários estímulos, como as prostaglandinas, peptídeos gastrointestinais e contato com o ácido gástrico, permanecendo principalmente

abaixo ou na camada mucosa. Deste modo, a superfície mucosa está em contato com um líquido com pH mais elevado do que o observado na luz do estômago. Em condições normais, o bicarbonato neutraliza os íons H^+ , enquanto se difunde através da camada de muco, estabelecendo um gradiente de pH entre a luz e as células epiteliais superficiais. A secreção de bicarbonato é inibida por antagonistas muscarínicos, agonistas α -adrenérgicos, antiinflamatórios, ácidos biliares, fumaça de cigarro e provavelmente pelo processo infeccioso desencadeado pela bactéria *Helicobacter pylori* (SZABO, 2014).

A camada de muco aderida à mucosa gástrica protege o epitélio contra o ácido, a pepsina e outros agentes necrotizantes, como o álcool e antiinflamatórios não esteroidais, sendo importante também na recuperação da mucosa gástrica. Esse muco, constituído por uma camada de glicoproteínas em forma de gel (mucina) insolúvel em água forma um fino revestimento sobre as células superficiais da mucosa protegendo-as das forças mecânicas da digestão, fornecendo lubrificação, retendo água e impedindo, mas não bloqueando, a difusão dos íons H^+ da luz para a membrana apical das células epiteliais (SZABO, 2014; IGE et al., 2016).

As prostaglandinas são sintetizadas pela ação da ciclooxigenase sob o ácido araquidônico, liberado dos fosfolipídios de membrana. O mecanismo pelo qual as prostaglandinas exercem sua ação citoprotetora não está bem esclarecido porém, sabe-se que as prostaglandinas das séries E, F e I são sintetizadas em quantidades substanciais por todo o trato gastrointestinal. Quando administradas exogenamente, estimulam a secreção de muco e bicarbonato e aumentam o fluxo sangüíneo da mucosa gástrica (PAWLIK et al., 2016).

O óxido nítrico é sintetizado por uma reação enzimática entre o oxigênio molecular e a L-arginina. O óxido nítrico desempenha um papel fundamental de sinalização nos sistemas cardiovascular e nervoso e atua também no sistema de defesa do organismo. No trato digestivo o óxido nítrico tem influência sobre a secreção de muco, fluxo sangüíneo, bem como sobre a resistência da mucosa à elementos agressores. Seu efeito citoprotetor se dá por promover vasodilatação e conseqüentemente um aumento do fluxo sangüíneo da mucosa gástrica, acelerando

a retirada dos íons H^+ nocivos à esta e ainda aumentando o aporte de nutrientes para a mesma (NUR AZLINA et al., 2015).

A presença de um importante agente antioxidante na mucosa gástrica tem sido freqüentemente relatada. A presença de grandes concentrações de substâncias sulfidrílicas não protéicas na mucosa estomacal, representadas principalmente pela glutathione reduzida, está intimamente relacionada com a citoproteção gástrica, por impedir a ação nociva de radicais livres tóxicos para as células desta mucosa (BIGHETTI et al., 2002; TARNAWSKI et al., 2013).

A infecção aguda pelo *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) está associada com variação na secreção de ácido clorídrico (WANG, et al., 2008). Os mecanismos pelos quais a bactéria inibe a secreção ácida são multifatoriais e incluem a produção da citocina pró-inflamatória, interleucina-1 β , repressão da atividade promotora da subunidade α da H^+K^+ -ATPase e vacuolização da citotoxina A (VacA) induzida por proteólise da Ezrin, proteína de ligação à actina que desempenha um papel no transporte do conteúdo túbulo vesicular de H^+K^+ -ATPase, para a membrana apical da célula parietal (SAHA et al., 2008).

A Infecção crônica pelo *H. pylori* resulta em hipocloridria ou hipercloridria, dependendo da severidade e da distribuição da gastrite. A maioria dos pacientes cronicamente infectados manifesta pangastrite, inflamação de ambos, antro e corpo, e produzem menos do que a quantidade normal de ácido. Em contrapartida, uma minoria de pacientes cronicamente infectados manifesta uma gastrite antral predominante e estão predispostos às úlceras duodenais. Esses pacientes apresentam uma redução de somatostatina e recíproco aumento da gastrina e da secreção ácida (KATO et al., 2008).

H. pylori também ativa neurônios sensoriais na mucosa oxíntica, que são acoplados a estimulação da somatostatina e, assim, à inibição da histamina e secreção ácida. A ativação de vias neurais pode explicar como um número relativamente pequeno de organismos na superfície pode inibir a secreção de ácido profundamente (ZHANG et al., 2014; ZAKI et al., 2014).

A erradicação da bactéria normaliza a secreção ácida, não só no estômago intacto, mas também na porção remanescente do estômago após antrectomia (SCHUBERT, 2009). A erradicação também está associada a um aumento de cerca de 250 vezes na expressão do RNAm da H⁺K⁺-ATPase (OSAWA et al., 2006; HOU; SCHUBERT, 2006).

2.3 Úlcera péptica

Mesmo com a marcada redução em sua incidência verificada nas últimas décadas, a doença ulcerosa péptica ainda permanece como uma das doenças com maior prevalência em todo mundo, sendo que algumas de suas complicações, como sangramento e perfuração, ainda são causa importante de morbimortalidade (TONETO et al., 2011).

Para o aparecimento da úlcera é necessária a coexistência de múltiplos fatores, alguns dependentes do próprio indivíduo e outros de agentes externos ou ambientais, conforme resumido no quadro 3. Ela é ocasionada pelo desequilíbrio entre os fatores defensivos da mucosa do estômago e duodeno e os fatores agressivos, desenvolvendo-se apenas nas regiões do tubo digestório banhadas por ácido e pepsina (TALLEY, 2016).

Quadro 3: Causas de úlcera péptica

Causas Comuns	Causas Raras
<ul style="list-style-type: none"> • Infecção por <i>Helicobacter pylori</i> • Uso de antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) 	<ul style="list-style-type: none"> • Síndrome de Zollinger-Ellison • Hiperpatireoidismo • Doenças granulomatosas (doença de Crohn, sarcoidose) • Neoplasias (carcinoma, linfoma, leiomioma, leiomiosarcoma) • Infecções (tuberculose, sífilis, herpes simples, citomegalovírus) • Tecido pancreático ectópico

Um dos fatores associados ao desenvolvimento de úlceras pépticas é a presença do microorganismo *Helicobacter pylori*. Provavelmente é adquirida na infância, e apenas uma parte dos portadores da bactéria apresentarão úlcera, decorrente de sua presença e ação no estômago. Assim, acredita-se que a doença ocorra em indivíduos que apresentam fatores adicionais à presença da bactéria, como a predisposição genética, por exemplo (COELHO et al., 2005). Além disto, há cepas mais e menos agressivas dentro desta espécie, e o tipo da bactéria infectante também apresenta relevância. *Helicobacter pylori* enfraquece a cobertura protetora de muco do estômago e duodeno, permitindo a passagem do ácido clorídrico. O ácido e a bactéria agridem a parede e causam uma ferida ou úlcera (Figura 1). *H. pylori* é capaz de sobreviver no ácido do estômago porque ela secreta enzimas para neutralizá-lo. Este mecanismo permite a bactéria migrar para a zona "segura", a camada protetora de muco (FEDERAÇÃO BRASILEIRA DE GASTROENTEROLOGIA, 2016).

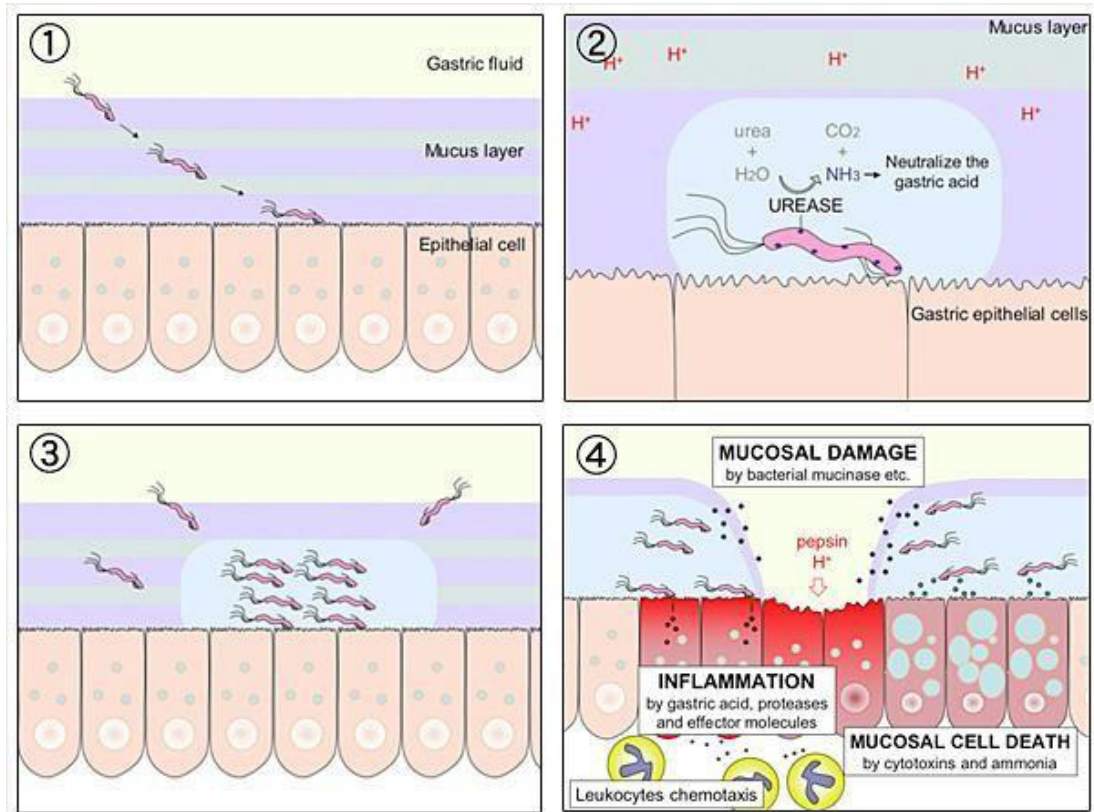


Figura 1: Ação de *Helicobacter pilory* na mucosa gástrica

Fonte: publichealth.arizona.edu

Nos pacientes com úlceras gástricas, a gastrite associada ao *H. pylori* é do tipo difusa ou predominante no corpo, e a inflamação dessa região, em que se concentram as células parietais, leva a uma redução da secreção ácida (UEMURA et al., 2001). Alterações genéticas do hospedeiro como polimorfismo do gene IL-1b aumenta a resposta de citocinas à infecção, levando a maior risco de atrofia e úlcera. A colonização é mais evidente na transição antro/corpo e é nesta região que predominam as ulcerações gástricas e os pacientes que apresentam este tipo de alterações também são os que têm mais risco de desenvolvimento de adenocarcinoma gástrico, fazendo com que bactéria seja considerada hoje um importante fator de risco para este tipo de câncer (MONICI et al, 2003). As alterações provocadas pelo *Helicobacter pylori* estão resumidas na Figura 2.

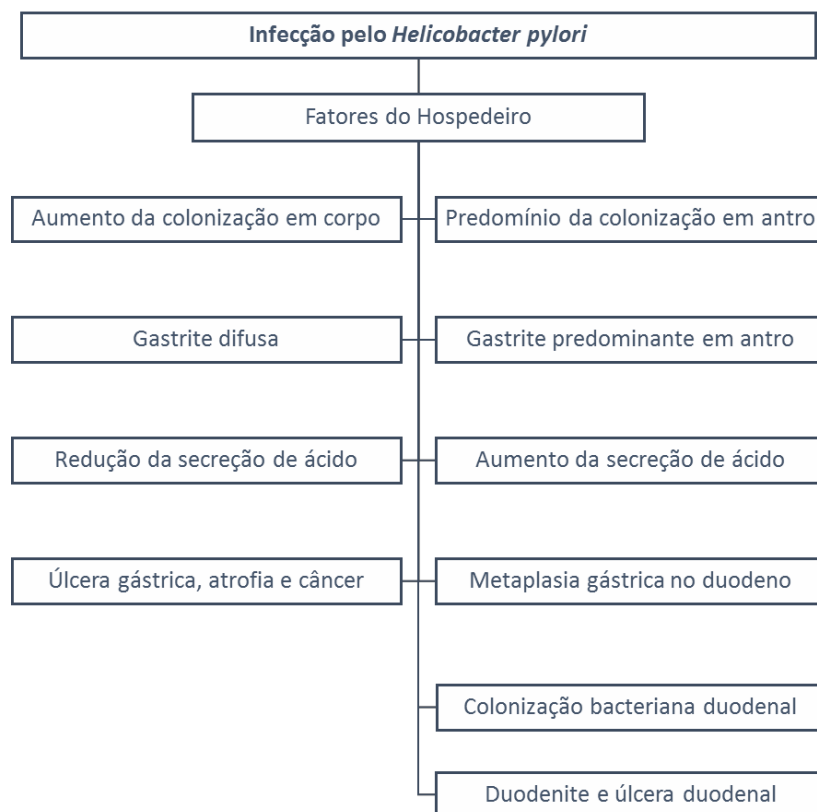


Figura 2: Interações propostas entre hospedeiro e *Helicobacter pylori* no desenvolvimento de lesões gastroduodenais. Fonte: MOCINI et al (2003)

Os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) podem induzir a lesões do trato gastrointestinal (TGI), principalmente no estômago, através de vários mecanismos (LU et al., 2015). A ação tópica dos AINES, na qual formas ionizadas do medicamento podem se acumular no interior de células epiteliais provocando lesão, e a eficiência da camada de gel mucoso como proteção, também parece estar diminuída pela perda da hidrofobicidade induzida pelos AINEs (CARLI et al., 2015). Bem descrito com a aspirina, este efeito tópico parece deixar de existir nos usuários crônicos em decorrência de uma adaptação da mucosa a esta ação, ou citoproteção adaptativa (THOMSEN et al., 2006; SZABO, 2014).

O mecanismo de ação dos AINEs é a redução sistêmica da síntese de prostaglandinas através da inibição da ciclooxigenase (COX). As prostaglandinas endógenas regulam o fluxo sanguíneo da mucosa, a regeneração de epitélio e a secreção de muco, bicarbonato e HCl. Sua inibição enfraquece a defesa da mucosa, predispondo às lesões (MONICI et al., 2003; KOTANI et al., 2006).

Uma vez que a COX-1 é constitutiva, tem se desenvolvido AINEs cada vez mais seletivos para a COX-2, como o rofecoxib e o celecoxib, devido existirem alguns estudos que mostram que estes compostos provoquem menos complicações da doença ulcerosa em relação aos AINEs não seletivos (TAKEUCHI, 2010; TAKEUCHI, 2012; AMAGASE et al., 2014).

O gastrinoma ou síndrome de Zollinger-Ellison é uma síndrome caracterizada por úlcera péptica, hipersecreção acentuada de ácido pelo estômago e tumor pancreático de células não pertencentes à linhagem beta das ilhotas pancreáticas (ALSHIKHO et al., 2016). São raros, ocorrendo um para cada mil casos de úlcera péptica associada ao *Helicobacter pylori*. A manifestação mais freqüente é a úlcera péptica duodenal, única ou múltipla, que ocorre em 90% a 95% dos pacientes (PHAN et al., 2015; ZHANG et al., 2016).

Alguns sinais indicativos da possibilidade de gastrinoma são: presença de úlcera única ou múltipla distal à primeira porção do duodeno, úlceras de difícil controle clínico, úlceras *Helicobacter pylori* negativas, úlceras recorrentes pós-operatórias, úlceras associadas a diarreia ou cálculo renal, e úlceras em pacientes

com história pessoal ou familiar sugestiva de tumor de hipófise ou paratireóide. (FEDERAÇÃO BRASILEIRA DE GASTROENTEROLOGIA, 2003).

2.4 Tratamento Farmacológico da Úlcera Péptica

As principais condições patológicas nas quais é útil reduzir a secreção ácida são a ulceração péptica, provavelmente causada por *H. pylori* e pelo desvio no equilíbrio entre mecanismos protetores e mecanismos agressores da mucosa gástrica; a esofagite de refluxo, lesão do esôfago provocada por suco gástrico e, a Síndrome de Zollinger-Éllison (FOX e MUNIRAJ, 2016). A terapia anti-secretória da úlcera péptica e da esofagite de refluxo envolve a diminuição da secreção de ácido com antagonistas dos receptores da histamina, do tipo H₂ ou inibidores da bomba de prótons e/ou a neutralização do ácido secretado com antiácidos (CABRAL, 2016).

2.4.1 Fármacos antagonistas dos receptores histaminérgicos H₂

Os antagonistas dos receptores da histamina, do tipo H₂, tem como representantes cimetidina, ranitidina, famotidina e nizatidina (MACLAREN et al., 2015). Este grupo tem como mecanismo inibir competitivamente as ações da histamina em todos os receptores H₂ e, sua principal aplicação clínica consiste na sua atuação como inibidores da secreção de ácido gástrico. Esses agentes reduzem a secreção ácida basal e estimulada por alimentos, histamina, insulina, aminoácidos e gastrina, além de promoverem a cicatrização das úlceras duodenais (GARG et al, 2014).

2.4.2 Fármacos inibidores da bomba de prótons

Os principais representantes desta classe são omeprazol, lansoprazol, pantoprazol, rabeprazol, esomeprazol e dexlansoprazol (BRAGA et al., 2011). Estes fármacos inibem de forma irreversível a H⁺/K⁺-ATPase ou bomba de prótons, responsável pela troca do K⁺ por H⁺ no processo de formação de HCl, que constitui

a etapa final na via da secreção ácida (CALVET, 2010). Apesar de ter meia-vida de cerca de uma hora, a administração diária de uma dose única afeta a secreção ácida durante 2-3 dias, e com uma posologia diária, verifica-se um efeito antissecretório crescente por um período de até cinco dias, quando atinge um platô (YANG et al., 2016). Os efeitos indesejáveis não são comuns, mas pode ocorrer cefaléia, diarreia e erupções cutâneas (SAVARINO et al., 2016).

2.4.3 Fármacos Antiácidos

Os antiácidos atuam ao neutralizar o ácido gástrico, elevando, assim o pH gástrico, e consistem em sais de magnésio e de alumínio, que formam cloretos de magnésio e de alumínio (DE FREITAS et al., 2006). Os sais de magnésio causam diarreia, enquanto os sais de alumínio provocam constipação, razão pela qual podem ser utilizadas misturas desses dois sais para preservação da função intestinal normal (BALEIRAS, 2000).

Apesar do bicarbonato de sódio elevar rapidamente o pH para 7, ocorre liberação de dióxido de carbono, que estimula a secreção de gastrina e pode resultar em elevação secundária da secreção ácida. Como ocorre absorção de bicarbonato de sódio no intestino, o uso de grandes doses ou administração frequente pode causar alcalose (CABRAL, 2016).

2.4.4 Fármacos que protegem a mucosa

Alguns representantes deste grupo são quelato de bismuto e misoprostol. O quelato de bismuto é usado em esquema de combinação no tratamento da infecção por *Helicobacter pylori* na úlcera péptica (COELHO et al., 2013). O fármaco possui efeito tóxico contra o bacilo, impede sua aderência à mucosa, inibe as enzimas proteolíticas da bactéria, reveste a base da úlcera, adsorve a pepsina, potencializa a síntese local de prostaglandinas e estimula a solução de bicarbonato (BEER NIETO, 2012).

O misoprostol é um análogo estável da prostaglandina E1, e seu mecanismo consiste em inibir a secreção ácida gástrica, tanto basal quanto a que ocorre em resposta a alimentos, histamina e cafeína através de uma ação direta sobre a célula parietal, bem como mantém o aumento do fluxo sanguíneo da mucosa e também a secreção de muco e de bicarbonato (LEE et al., 2014). É utilizado na prevenção da lesão gástrica que pode ocorrer com o uso crônico de AINES. Podem ocorrer diarreia, cólicas abdominais e contração uterina (CAVIERES, 2011).

2.4.5 Fármacos que atuam no controle de *Helicobacter pylori*

Hoje está bem estabelecido que a erradicação do *H. pylori* promove remissão da gastrite ativa e reduz, dramaticamente, a incidência e/ou recorrência da doença ulcerosa (BEER NIETO, 2012). Eficazes em aliviar a dor e cicatrizar a lesão ulcerosa, nos pacientes portadores de úlcera péptica e infecção por *H. pylori*, os fármacos disponíveis (antiácidos, antagonistas dos receptores H₂, sucralfato e inibidores da bomba de prótons) são incapazes de manter a úlcera cicatrizada, mesmo com os pacientes utilizando-os de forma crônica (YOON et al, 2015). Somente após o tratamento visando erradicar o *H. pylori*, tem-se conseguido reduzir drasticamente ou mesmo abolir a recidiva da úlcera (SATO et al, 2016).

O quadro 4 apresenta os esquemas terapêuticos recomendados pelo Consenso Brasileiro sobre *Helicobacter pylori* (COELHO et al., 2013).

Além do regime mundialmente recomendado, que indica o uso de um inibidor de bomba protônica associado a fármacos antimicrobianos, tais como amoxicilina e claritromicina, que apresenta índices de erradicação entre 80% e 90%, o Consenso Brasileiro optou também por sugerir dois outros regimes contendo furazolidona (COELHO et al., 2013). A associação de furazolidona, claritromicina e IBP é particularmente útil para pacientes com impedimento para o uso de amoxicilina. A associação de tetraciclina, furazolidona e IBP foi incluída como forma de oferecer opção terapêutica envolvendo antimicrobianos que, hoje, acham-se disponíveis para a população na rede do Sistema Único de Saúde (COELHO e COELHO, 2016).

A estratégia hoje utilizada consiste na associação de fármacos antissecretórios associado a dois antibacterianos por um período de sete dias (GARGALLO et al., 2012).

Estudos têm comprovado que, habitualmente, não é necessário o prolongamento do uso de antissecretórios após o final do tratamento para erradicação. Constitui exceção a esta recomendação o tratamento antibacteriano logo após episódio de hemorragia digestiva ou cirurgia para úlcera perfurada, condições de potencial gravidade, em que se recomenda o uso de anti-secretórios por quatro a oito semanas depois do tratamento de erradicação, visando a obtenção de cicatrização mesmo em situações onde o microorganismo possa não ter sido erradicado (SILVA et al., 2015).

Quadro 4: Esquemas de tratamento para erradicação de *Helicobacter pylori* na úlcera péptica

- 1- **INIBIDOR DE BOMBA PROTÔNICA (IBP) EM DOSE PADRÃO** (Omeprazol 20 mg, lansoprazol 30 mg, pantoprazol 40 mg) + **AMOXICILINA 1,0 g + CLARITROMICINA 500 mg**, duas vezes ao dia, durante sete dias.
- 2- **IBP EM DOSE PADRÃO**, uma vez ao dia + **CLARITROMICINA 500 mg**, duas vezes ao dia + **FURAZOLIDIONA 200 mg**, duas vezes ao dia, durante sete dias.
- 3- **IBP EM DOSE PADRÃO**, uma vez ao dia + **FURAZOLIDIONA 200 mg**, três vezes ao dia + **CLORIDRATO DE TETRACICLINA 500 mg**, quatro vezes ao dia, durante sete dias.

Fonte: COELHO et al., 2013.

Um aumento da resistência aos antibióticos, usados na terapia tripla, deve ser considerado na seleção do tratamento mais apropriado. O tratamento deve alcançar taxas de erradicação superiores a 80%. Uma terapia quádrupla contendo bismuto, durante dez a quatorze dias, é uma opção viável como tratamento de primeira linha. Este tipo de tratamento tem levado a resultados satisfatórios em termos de taxas de erradicação da bactéria, apesar do aumento da resistência por parte desta à claritromicina e ao metronidazol (MALFERTHEINER et al., 2007).

2.5 Própolis e Geoprópolis

As abelhas coletam resinas de diferentes partes das plantas e adicionam suas secreções mandibulares produzindo a própolis, um material resinoso de estrutura complexa contendo aproximadamente 50% de resinas e bálsamos vegetais, 30% de cera, 10% de óleos, 5% de pólen e 5% de outras substâncias, podendo variar de acordo com a flora da região e a espécie de abelha (BURDOCK, 1998).

As abelhas sem ferrão, ou meliponíneos, são insetos sociais de grande diversidade e ampla distribuição geográfica, com ocorrência em grande parte das regiões tropicais da Terra, ocupando praticamente toda a América Latina e África, além do sudeste asiático e norte da Austrália (VILLAS-BÔAS, 2012; DA SILVA et al., 2014). Entretanto, é nas Américas que grande parte da diversidade de espécies ocorre – são aproximadamente 400 tipos descritos, conforme catalogação recente – e que a cultura de criação destes insetos se manifesta de forma mais intensa.

Antes da chegada da abelha *Apis mellifera* no continente americano, o mel das abelhas nativas caracterizava-se como principal fonte de energia, e o conhecimento tradicional tornou a domesticação das abelhas sem ferrão uma tradição popular que se difundiu principalmente nas regiões norte e nordeste do Brasil. A herança indígena é evidenciada pelos nomes populares de muitas espécies, como Jataí, Uruçu, Tiúba, Mombuca, Irapuá, Tataíra, Jandaíra, Guarupu, Manduri entre outras (VILLAS-BÔAS, 2012). A seguir o quadro 5 mostra as principais espécies de meliponíneos presentes no nordeste brasileiro.

Quadro 5: Principais espécies de abelhas produtoras criadas na região nordeste do Brasil

Nome Científico das espécies de abelha	Nome(s) Popular(es)	Estados do Nordeste do Brasil
<i>Melipona asilvai</i>	Monduri, Rajada	AL, BA, CE, PB, PE, PI, RN, SE
<i>Melipona mandacaia</i>	Mandaçaia	AL, BA, CE, PB, PE, PI, RN, SE
<i>Melipona quadrifasciata</i>	Mandaçaia	AL, BA, PB, PE, SE
<i>Melipona scutellaris</i>	Uruçu, Uruçu-Nordestina, Uruçu-Verdadeira	AL, BA, CE, PB, PE, RN, SE
<i>Melipona subnitida</i>	Jandaíra, Uruçu	AL, BA, CE, MA, PB, PE, PI, RN, SE
<i>Melipona fasciculata</i>	Tiúba	MA, PI

FONTE: VILLAS-BÔAS, 2012 – Adaptado

No estado do Maranhão, *Melipona fasciculata* Smith, também conhecida como “tiúba” é cultivada há séculos pela população indígena para a produção de mel. Atualmente são criadas comercialmente em agrupamentos de colônias, denominados meliponários, constituindo a meliponicultura (KERR, 1987; DUTRA et al., 2008). A classificação taxonômica de *Melipona fasciculata* Smith está indicada a seguir:

Classe: Insecta

Ordem: Hymenoptera

Superfamília: Apoidea

Família: Apidae

Subfamília: Apinae

Tribo: Meliponini

Gênero: *Melipona*

Espécie: *Melipona fasciculata* Smith

Os meliponíneos produzem própolis ou geoprópolis, e a quantidade destes produtos na colmeia varia de acordo com a espécie de abelha (KERR, 1987).

Diferente da própolis, para elaboração da geoprópolis, além do material vegetal, algumas espécies de abelhas indígenas sem ferrão adicionam terra ou barro à sua composição (FREITAS et al., 2008). As resinas vegetais compreendem a principal matéria-prima da geoprópolis, mas a presença de terra é a característica marcante deste produto (NOGUEIRA-NETO, 1997).

Em colônias de abelhas sem ferrão, a aplicação da própolis e seus derivados é mais ampla, servindo também para a construção de estruturas externas (tubos de entrada) e internas (favos de cria, lamelas de invólucro e potes de alimento) das colônias (VENTURIERI et al., 2003; SANTOS et al., 2009).

Diversas atividades biológicas já foram demonstradas em estudos com própolis e geoprópolis, de diferentes origens, com destaque para as atividades antineoplásica, antioxidante e antimicrobiana. Estas e outras atividades biológicas estão sumarizadas no quadro 6.

Quadro 6: Atividades biológicas da própolis e geoprópolis, em estudos publicados de 2006 a 2016

Espécie	Material	Localização	Atividade Biológica	Autores
<i>Populus sp.</i>	Própolis	China	Antineoplásica	XUAN et al (2014)
	Própolis	Vietnã	Antioxidante	GREGORIS & STEVANATO (2010)
<i>Trigona laeviceps</i>	Própolis	Taiândia	Antineoplásica	CHANCHAO et al (2011); UMTHONG et al (2011); TEERASRIPREECHA et al (2010)
<i>Dalbergia ecastophyllum</i>	Própolis	Brasil	Antineoplásica e Antioxidante	DE MENDONÇA et al (2015).
<i>Apis mellifera</i>	Própolis	Tunísia	Anticariogênico e Antineoplásico	KOUIDHI et al (2010)
	Própolis	Portugal	Antineoplásico	VALENTE et al (2011)
	Própolis	Sérvia	Antineoplásico	MILOŠEVIĆ-ĐORĐEVIĆ et al (2015).
	Própolis	Portugal	Antineoplásica e distúrbios do metabolismo glicolítico	VALENCA et al (2013)
	Própolis	Turquia	Antineoplásica	BARLAK et al (2011).
	Própolis	Brasil	Fertilidade	CAPUCHO et al (2012)
	Própolis	China	Antioxidante	GUO et al (2011)
	Própolis	Portugal	Proteção da membrana eritrocitária	MOREIRA et al (2011)
(-)	Própolis	Irã	Antioxidante	AGHEL et al (2014)
	Própolis	Brasil	Antioxidante e Antimicrobiana	ARAÚJO et al (2015)
	Própolis	Polônia	Antioxidante	TYSZKA-CZOCHARA et al (2014)
	Própolis	Brasil	Antineoplásica	KAMIYA et al (2012)
	Própolis	Brasil	Antioxidante	ATTIA et al (2012)
	Própolis	Índia	Antioxidante	LASKAR et al (2010)
	Própolis	Polônia	Antineoplásico	SZLISZKA et al (2013)
<i>Baccharis dracunculifolia</i>	Própolis	Brasil	Gastroprotetora ou antiulcerogênica ou antidiarreica.	LEMONS et al (2007); BARROS et al (2007); NAKAMURA et al. (2014).

(-): Espécie não indicada no estudo

Quadro 6: Atividades biológicas de Própolis e geoprópolis, em estudos publicados de 2006 a 2016 (Continuação)

Espécie	Material	Localização	Atividade Biológica	Autores
<i>Apis mellifera</i>	Própolis	Uruguai	Antioxidante	SILVA et al (2011)
	Própolis	Brasil	Antioxidante e antimicrobiana	OLDONI et al (2011)
	Própolis	Brasil	Antioxidante e antimicrobiana	ALENCAR et al (2007)
	Própolis	Croácia	Antioxidante e antimicrobiana	JUG et al (2014)
<i>Castanea sativa</i>	Própolis	Portugal	Antioxidante	MOREIRA et al (2008); MIGUEL et al (2014)
(-)	Própolis	Itália	Antioxidante e fotoprotetora	GREGORI et al (2011)
	Própolis	Brasil	Antioxidante	SHENG et al (2007)
	Própolis	México	Antioxidante e antimicrobiana	Vargas-Sanchez et al (2014)
<i>Melipona scutellaris</i>	Geoprópolis	Brasil	Antimicrobiano e antiproliferativo	DA CUNHA et al (2013)
	Geoprópolis	Brasil	Antimicrobiano	DA CUNHA b et al (2013)
	Geoprópolis	Brasil	Antiinflamatória	FRANCHIN et al (2013)
	Geoprópolis	Brasil	Antiulcerogência	RIBEIRO-JUNIOR et al (2015)
<i>Melipona subnitida</i>	Geoprópolis	Brasil	Antioxidante	DE SOUZA et al (2013)
<i>Scaptotrigona postica</i>	Geoprópolis	Brasil	Antiviral	COELHO et al (2015)
<i>Melipona fasciculata</i>	Geoprópolis	Brasil	Antiinflamatória	LIBÉRIO et al (2011)
	Geoprópolis	Brasil	Antineoplásica	CINEGAGLIA et al (2013)

(-): Espécie não indicada no estudo

Estudos sobre as atividades da própolis e da geoprópolis no trato gastrointestinal tem sido relatada nos últimos dez anos. O extrato hidroalcoólico bruto de própolis verde do sudeste brasileiro foi avaliado por Barros et al (2007) em modelos de úlcera induzidas por etanol, indometacina e stress, e ligadura do piloro, em ratos. Segundo os autores, o extrato nas doses de 250 e 500 mg/Kg demonstrou redução significativa na área ulcerada e percentual de lesões em relação ao grupo controle, e também foi observada a atividade antissecretória, com redução do volume gástrico. Estas atividades também foram confirmadas no estudo realizado

por Lemos et al (2007) com extrato hidroalcoólico de própolis verde de *Baccharis dracunculifolia*, que demonstraram redução das lesões e atividade antissecretória.

A avaliação da atividade antiulcerogênica dos ácidos fenólicos, caféico, ferrúlico, p-cumárico e cinâmico, obtidos da própolis verde, mostrou redução significativa das lesões gástricas nas doses de 50 e 250 mg/kg dos ácidos, em modelos de indução de úlcera induzida por antiinflamatórios não-esteroidais (AINEs), etanol e stress, além da redução da secreção gástrica. Também foram evidenciados redução significativa em parâmetros da secreção gástrica, como o volume de suco gástrico e acidez total (BARROS et. al., 2012).

A atividade laxante da própolis verde foi estudada por Kakino et al (2012), em extratos aquoso e hidroalcoólico nas doses de 10, 50, 100 e 500 mg/Kg, em camundongos, nos quais foi investigado o trânsito gastrintestinal e a contração do íleo. Foram observados resultados significativos, como o aumento do trânsito intestinal para o extrato aquoso, no modelo estimulado por Clonidina, já o extrato hidroalcoólico produziu um aumento da contração do íleo.

Estudo posterior realizado para investigar o efeito protetor de extrato hidroalcoólico de própolis verde contra lesões da mucosa gástrica em ratos Wistar machos expostos ao stress de imobilização de imersão em água (wirs), durante 6 h foi comparado entre a sua pré-administração repetida (50 mg/kg/dia durante 7 dias) e o sua pré-administração única (50 mg/kg). Os experimentos demonstraram que as administrações repetidas produziram um menor número de lesões de úlcera induzidas por stress e menor infiltração de leucócitos em comparação aos animais que receberam única administração de própolis, levando possivelmente ao um envolvimento de ações antioxidantes e anti-inflamatórias (NAKAMURA et al., 2014).

O estudo de Ribeiro-Junior et al (2015) que avaliou o efeito gastroprotetor e mecanismo de ação do extrato etanólico de geoprópolis de *Melipona scutellaris* mostrou que na dose de 300 mg/kg, o extrato produziu um efeito antiulcerogênico no modelo de úlceras induzidas por etanol, e o relacionou com a produção de óxido nítrico e prostaglandinas.

A composição química da geoprópolis ou própolis depende da especificidade da flora local de coleta. Muitos constituintes foram identificados a partir principalmente da própolis, e compostos fenólicos, tais como os flavonóides, ácidos fenólicos e ésteres de ácidos fenólicos, têm sido relatados como principais constituintes da própolis de zonas tropicais (DE SOUZA et al., 2013). Estudos químicos realizados com a geoprópolis produzida pela espécie de abelha *Melipona fasciculata*, identificaram vários compostos secundários, com destaque para os compostos fenólicos (DUTRA et al., 2008; DA SILVA et al., 2013; DUTRA et al., 2014).

Dutra et al. (2008) visando estabelecer dados para o controle de qualidade e padronização da geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith, originada na baixada maranhense, realizou a avaliação farmacognóstica do extrato hidroalcoólico realizando análises sensoriais, abordagem química, perfis cromatográficos e determinação dos teores de flavonóides. No referido estudo foi observado que as amostras da geoprópolis desta região apresentaram compostos fenólicos em maior concentração, além de substâncias da classe dos terpenos e saponinas e ausência de alcalóides. Os perfis cromatográficos indicaram que a composição e concentração das substâncias químicas eram diferentes entre as amostras. Os teores de flavonóides variaram de 0,17 - 2,6%, os quais para a maioria das amostras apresentaram valores acima do mínimo exigido pela legislação brasileira para própolis de *Apis mellifera*.

Em estudo posterior realizado com extratos hidroalcoólicos da geoprópolis de *Melipona fasciculata* coletadas nos municípios de Fernando Falcão, Palmeirândia e São Bento, regiões distintas do estado do Maranhão, também mostraram a presença de compostos fenólicos totais (67,4%, 14,6% e 51,2%, respectivamente), flavonóides e triterpenos em duas das três amostras, reforçando as diferenças de concentrações de compostos químicos na geoprópolis de acordo com a região em que a amostra é coletada (LIBÉRIO et al, 2011).

Dutra et al. (2014) realizaram um estudo com o extrato hidroalcoólico e diferentes frações da geoprópolis de *Melipona fasciculata* obtida do cerrado maranhense, no município de Fernando Falcão, nos quais caracterizou a presença

de ácidos fenólicos e taninos hidrolisáveis (elagitaninos e galactotaninos), de forma a detalhar a composição química da referida amostra, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detector “Diode Array” e espectrometria de massa (HPLC – DAD – MS). Diversos compostos fenólicos foram identificados neste estudo, tais como ácido elágico, corilagina, HHDP-glicose, ácido elágico, dentre outros.

Justificativa

3. JUSTIFICATIVA

Neste trabalho será foi utilizado o extrato hidroalcoólico da geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith do cerrado maranhense, do município de Fernando Falcão. Conforme descrito anteriormente, esta geoprópolis apresenta ácidos fenólicos e taninos hidrolisáveis, metabólitos que apresentam atividades antioxidante e gastroprotetora e antiulcerogênicas demonstradas na literatura científica.

Além disso, estudos realizados por diferentes autores, citados neste trabalho, mostraram atividades no trato gastrointestinal, com diferentes extratos de própolis (LEMOS et al., 2007; BARROS et al, 2007; BARROS et al., 2012; NAKAMURA et al., 2014) e geoprópolis (RIBEIRO-JUNIOR et al., 2015) brasileiros.

Considerando os fatores indicados acima, associados à necessidade de buscar fármacos antiulcerogênicos mais eficazes e mais seguros em comparação à terapia farmacológica atual, justifica-se a necessidade de validar a atividade gastroprotetora do extrato hidroalcoólico liofilizado da geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith (EHG), conhecida popularmente como “tiúba”, oriunda do cerrado maranhense.

Objetivos

4. OBJETIVOS

4.1. Geral

Avaliar a atividade antiulcerogênica e gastroprotetora do extrato hidroalcoólico liofilizado da geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith (tiúba) (EHG), do cerrado maranhense.

4.2. Específicos

CAPÍTULO I

Verificar a ação de EHG em modelos experimentais de úlcera gástrica;

Investigar o efeito de EHG na secreção gástrica;

Avaliar o efeito de EHG no trânsito intestinal e no esvaziamento gástrico.

CAPÍTULO II

Investigar a atividade cicatrizante de EHG sobre o modelo de indução de úlceras por ácido acético;

Elucidar possíveis mecanismos de ação envolvidos da atividade gastroprotetora de EHG da geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith.

CAPÍTULO III

Validar formulações farmacêuticas de uso oral para distúrbios gástricos tendo como componente ativo o extrato da geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith.

Capítulo I

5. CAPITULO I

Artigo a ser submetido ao periódico *European Journal of Pharmacology*

(ISSN: 0014-2999)

Fator de impacto: 2.532

Qualis: B1 (Biotecnologia – 2014)

“Antiulcerogenic Activity of the Geopropolis of *Melipona fasciculata* Smith”

Antiulcerogenic Activity of the Geopropolis of *Melipona fasciculata*

Smith

Débora Luana Ribeiro Pessoa^a, Marilene Oliveira da Rocha Borges^{a*}

Laboratory of Pharmacology, Department of Physiological Sciences, Universidade Federal do Maranhão, Av. dos Portugueses, 1966, Cidade Universitária Dom Delgado, 65085-580, São Luis, Maranhão, Brazil.

*Corresponding Autor: Marilene Oliveira da Rocha Borges

E-mail: rocha.marilene@ufma.br

Tel:+ 55 (98) 3272-8533; Fax:+ 55 (98) 3272-8004

Permanent address: Laboratory of Pharmacology, Department of Physiological Sciences, Universidade Federal do Maranhão, Av. dos Portugueses, 1966, Cidade Universitária Dom Delgado, 65085-580, São Luis, Maranhão, Brazil

ABSTRACT: Geopropolis is a mixture of plant resins with waxes and earth, produced by stingless bees (Meliponinae). Geopropolis is traditionally used to treat inflammatory processes, as cicatrizant, neoplasms, hemorrhoids, gastritis and coughing. This study investigated the antiulcerogenic activity of the hydroalcoholic extract of the geopropolis (EHG) produced by *Melipona fasciculata*. The geopropolis was collected in a meliponary in the Fernando Falcão city, in the state of Maranhão, Brazil. The EHG was produced by maceration with 70% ethanol. The antiulcerogenic activity was evaluated using model ulcer induced by ethanol and indomethacin, in Swiss mice. In addition, we evaluated the parameters of gastric secretion by pylorus ligation model and the gastric emptying and intestinal transit in Wistar rats. In the induction of ulcers with 75% ethanol, the EHG, 50 or 100 mg/kg, orally administrated, reduced the ulcerated area by 66.6% and 93.2%, respectively, when compared to the control group ($127.7 \pm 9.5 \text{ mm}^2$). Similarly, in the induction of ulcers with indomethacin, the EHG (50 or 100 mg/kg) reduced the ulcerated area by 82.9% and 92.5%, respectively, in relation to control group ($119.3 \pm 24.2 \text{ mm}^2$). The histopathological analysis of the stomachs of animals treated with EHG revealed no acute erosion and the epithelium, the superficial layer showed little change, when compared to the control group, which showed a reduction in epithelial integrity. The extract alter the volume (200 mg/kg, $p < 0.05$) and acidity (100 and 200 mg/kg, $p < 0.05$) parameters of the gastric juice. A reduction in intestinal transit could be observed with EHG when compared to the control group. The study revealed the antiulcerogenic effect of the hydroalcoholic extract of the geopropolis of *Melipona fasciculata* according to the ulcer gastric induction models.

Keywords: gastric ulcer. stingless bee. geopropolis. *Melipona fasciculata*.

1 INTRODUCTION

Peptic ulcers, one of the main gastrointestinal diseases, are caused by multiple factors, including stress, smoking, nutritional deficiencies, noxious agents, such as alcohol and nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), and infection by *Helicobacter pylori*, among others (SILVA et al., 2012).

The treatment options for stomach ulcers include antacids, sucralfate, prostaglandins analogs, muscarinic antagonists, H₂ blockers, proton pump inhibitors (PPI), and triple therapy containing a proton pump inhibitor combined with an antibiotic, to eradicate the infection by *Helicobacter pylori* (FOCK et al., 2009). These drugs can cause severe adverse reactions, such as thrombocytopenia (ZLABEK; ANDERSON, 2002), acute interstitial nephritis (RA; TOBE 2004), nephrotoxicity and hepatotoxicity (FISHER; LE COUTEUR, 2001), and anaphylactic reactions (GONZALEZ et al., 2002). In addition, treatment usually takes long and is associated with high costs. A continuous search for new effective antiulcer substances is therefore taking place.

Propolis is one of the many natural products that have been used for centuries by mankind (Vargas et al., 2004). A wide variety of pharmacological properties of propolis has already been reported, such as its anti-inflammatory (FRANCHIN et al., 2016), antimicrobial (VARGAS-SÁNCHEZ et al., 2014), antioxidant (NINA et al., 2015), anti-neoplastic (CHAN et al, 2012), analgesic (KOMOSINSKA-VASSEV et al., 2015), anticariogenic (ACKA, 2016), antiviral (YILDIRIM et al., 2016) and, also, antiulcerogenic activity (DE BARROS et al., 2008).

The therapeutic effects of propolis have been attributed to its several polyphenolic compounds, including flavonoids and phenolic acids, which are some of

the most reported secondary metabolites. A study by Barros et al. (2008) has associated the antiulcerogenic activity of green propolis with the phenolic acids in its composition.

The stingless bee species *Melipona fasciculata* Smith of the Meliponini tribe can be found in South America. In the state of Maranhão, Brazil, *Melipona fasciculata* Smith is known as tiúba and has been cultivated for centuries by the indigenous population for its honey, especially in the vegetation reserves in the different ecosystems of the region that allow. It collects resinous material of plants and mixes it with the wax produced in the hive, salivary secretions and even with soil to form geopropolis (KERR, 1987).for its breeding (BANKOVA; CASTRO; MARCUCCI, 2000).

Geopropolis is rich in such chemical compounds as phenolic acids, triterpenes and hydrolysable tannins (DUTRA et al, 2014). Assunção (2008) showed that the hydroalcoholic extract of the geopropolis from *Melipona fasciculata* has antibacterial activity *in vitro and in vivo*. Dutra et al (2014) demonstrated the antioxidant activity of the geopropolis extract of this bee. Other activities demonstrated for *Melipona fasciculata* and other Meliponini species include antimicrobial (DA CUNHA et al., 2013), antinociceptive (FRANCHIN et al., 2012), antioxidant (SOUZA et al., 2013), antineoplastic (CINEGAGLIA et al., 2013), anti-inflammatory (FRANCHIN et al., 2013), and antiviral properties (COELHO et al., 2015). A study conducted by Ribeiro-Junior et al (2015) reported the gastroprotective effects of the geopropolis of another species of the same genus, *Melipona scutellaris*, found in state of Bahia, northeast of Brazil.

The objective of this study was therefore to investigate the antiulcerogenic potential of the geopropolis produced by the bee *Melipona fasciculata* Smith.

2-MATERIALS AND METHODS

2.1 Geopropolis Sample

The geopropolis of *Melipona fasciculata* Smith was collected from the internal parts of a hive with the help of sterilized spatulas in a meliponary located in the city of Fernando Falcão (6°7'30"S 44°52'30"W), in the southeastern region of the state of Maranhão, Brazil, in November 2008. After collection, the material was stored in sterilized glass bottles amber and kept under refrigeration (4°C).

2.2 Preparation of the Hydroalcoholic Extract of the Geopropolis (EHG)

The geopropolis *in natura* was pulverized in a cutting mill, and the powder (500 g) was macerated with 70% ethanol at a ratio of 1:2 (p/v) for 48 h. The resulting extractive solution was filtered to remove the soil and then concentrated on a rotary evaporator under reduced pressure at 40°C, obtaining the hydroalcoholic extract of the geopropolis (EHG) (DUTRA et al.,2008). It was then freeze-dried, presenting a yield of 8.8%.

2.3 Animals

The experiments were performed with male, adult Wistar rats (*Rattus norvegicus*), weighing between 250-300g, and with male Swiss mice (*Mus musculus*), weighing between 25-30 g, both from the vivarium at the Universidade Federal do Maranhão (UFMA). The animals had access to food and water *ad libitum* and were maintained in a controlled environment with light/dark (12 h) cycles and temperatures ranging between 22 ± 2°C. The experimental protocols developed in

this study were approved by the Ethics Committee of the Universidade Federal do Maranhão (CEUA), report number 09/14.

2.4 Pharmacological Evaluation Tests

2.4.1 Ethanol-Induced Gastric Lesions

The ethanol-induced gastric lesions were obtained according to the method of Robert et al. (1979), with modifications. The mice were fasted for 16 hours, separated into groups (n = 6) and treated orally with a solution of 0.9% NaCl (0.1 mL/10 g, control group), pantoprazole (40 mg/kg) or EHG (50 and 100 mg/kg). After one hour of treatment, the gastric lesions were induced by the administration of 75% ethanol (0.1 mL/10 g). One hour after the induction of the ulcer, the animals were euthanized in a CO₂ chamber and their stomachs were removed and opened. The mucosa was washed gently with distilled water. The stomachs were then placed between two glass slides for demarcation of the lesions, which were evaluated in mm² using the Image J[®] Launcher software and the data expressed in mm².

2.4.2 Indomethacin-Induced Gastric Lesions

The mice were fasted for 16 hours, separated into groups (n = 6) and treated orally with a solution of 0.9% NaCl (0.1 mL/10 g, control group), pantoprazole (40 mg/kg) or EHG (50 and 100 mg/kg). After an hour of treatment, the gastric lesions were induced by the subcutaneous administration of indomethacin at a dose of 30 mg/kg (DJAHANGUIRI, 1969). Four hours after the induction of the ulcer, the animals were euthanized in a CO₂ chamber and their stomachs were removed and opened.

The mucosa was washed gently with distilled water, after which the lesions were analyzed as described above.

2.4.3 Histopathological Analysis

After a macroscopic evaluation, the stomachs of the animals where the ulcer was induced by ethanol were placed in a 10% buffered formaldehyde solution. After 24 h, the pieces were sectioned transversely and longitudinally, dehydrated in alcohol, cleared in xylene and embedded in paraffin wax in the form of blocks. 5 μ m thick histological sections were obtained using a microtome and blades subjected to Hematoxylin/Eosin (HE) coloring and observed in an optical microscope. The morphological characteristics of the gastric mucosa were observed and the potential pathological changes found were described (AL-QARAGHULI et al., 2013).

2.4.4 Determination of the gastric acid secretion

After fasting for 24 h, rats were divided into four groups ($n = 5$), and anesthetized with xylazine (10 mg/kg) and ketamine (50 mg/kg). Through an incision in the abdomen, the stomach was located and the pylorus tied with thread. Next, a saline solution (0.1 mL/100g), omeprazole (20 mg/kg) or EHG (100 or 200 mg/Kg) was administered intraduodenally and the abdominal wall was sutured. After four hours, the animals were euthanized in a CO₂ chamber to remove their stomach, gather the gastric content and centrifuge it at 1077 x g for 10 min. The supernatant was transferred to a beaker, the final volume was determined and completing the volume to 10 mL with distilled water. The pH was then determined in a digital pH meter and the total acidity by titration with NaOH 0.1 N, using phenolphthalein as acid-base indicator (VISSCHER et al., 1954).

2.4.5 Gastric Emptying

Mice (n=6) received water (0.1 mL/10g, p.o, control group), atropine (3 mg/kg, subcutaneously), and EHG in doses of 100 or 200 mg/kg (p.o). An hour after the treatments, the animals received by intragastric gavage 0.5 mL of 0.5% phenol red dissolved in carboxymethylcellulose at 1.5%. After 20 min this administration, the animals were euthanized in a CO₂ chamber. Their abdominal cavity was opened, the pylorus and the distal part of the esophagus were pinched to avoid loss of gastric content, which was collected and then opened and washed with distilled water. The collected gastric content was centrifuged at 269 x g for 30 min. The 600 µL of supernatant was added to an equal volume of NaOH 1.0 N and the resulting solution was read in a spectrophotometer at 560 nm. A control group time zero (T₀) was also performed with a group of animals that received the dye and was immediately euthanized, thus considering 0% of emptying. The results were expressed as the phenol red concentration (µg) retained in the stomach (CORUZZI et al., 1980).

2.4.6 Intestinal Transit

After removing the stomach to evaluate the gastric emptying, as per item 2.4.5, the small intestine was removed to evaluate the distance traveled by the phenol red. With the aid of a ruler, the total length of the small intestine of each animal was measured from the pylorus to the ileocecal valve, as well as the distance traveled by the phenol red until the last portion that contained at least continuous 1 cm of the marker. The intestinal transit was expressed by the percentage of the

distance traveled by the marker in relation to the total length of the small intestine (STICKNEY AND NORTHUP, 1959).

2.5 Statistical Analysis

The results were expressed as mean \pm standard error of the mean. The data analysis was performed using analysis of variance (one-way ANOVA), followed by Tukey's test, using the GraphPadPrism software, version 5.00. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

3 RESULTS

3.1 Effect of the Hydroalcoholic Extract of Geopropolis (EHG) on Ethanol-Induced Gastric Lesions

The oral administration of 75% ethanol to animals pretreated with saline (control) produced an ulcerated area of $127.7 \pm 9.5 \text{ mm}^2$. Pretreatment with pantoprazole (40 mg/kg) and EHG (50 and 100 mg/kg) significantly reduced the ulcerated area in 66.6% and 93.2%, respectively, in relation to the control group ($p < 0.05$). A significant reduction of the lesions in the treatment with EHG 100 mg/kg was also observed in relation to the pantoprazole group (Table 1).

3.2 Effect of the Hydroalcoholic Extract of Geopropolis (EHG) on Indomethacin-induced Gastric Lesions

The oral administration of indomethacin to animals pretreated with saline produced an ulcerated area of $119.3 \pm 24.2 \text{ mm}^2$. EHG significantly reduced ($p <$

0.05) the ulcerated area at the doses of 50 and 100 mg/kg in 82.9% and 92.5%, respectively (Table 2).

3.3 Histopathological Analysis

The histopathological analysis of the stomach of animals treated with ethanol as aggressor revealed the change of the gastric epithelium (Figure 1). In the group treated with EHG (50 mg/kg), no acute erosion was observed and the epithelium, the mucous and muscle surface layer, remained intact. The animals treated with EHG (100 mg/kg) had a preserved mucosal epithelium, with a mild inflammatory infiltrate (Figure 1).

3.4 Effect of the Hydroalcoholic Extract of Geopropolis (EHG) on Gastric Acid Secretion

The intraduodenal treatment with EHG produced a significant reduction ($p < 0.05$) in the volume of gastric secretion at the dose of 200 mg/kg (2.90 ± 0.20 mL), and in total acidity at the doses of 100 and 200 mg/kg, compared to the control group (Table 3). EHG did not produce significant changes in pH in relation to the control group (saline).

3.5 Effect of the Hydroalcoholic Extract of Geopropolis (EHG) on Gastric Emptying and Intestinal Transit

The hydroalcoholic extract of the geoprópolis of *M. fasciculata* Smith (EHG) It did not alter gastric emptying at the doses of 100 mg/kg (3.7 ± 0.1 $\mu\text{g/mL}$) and 200 mg/kg (3.0 ± 0.6 $\mu\text{g/mL}$), when compared with the control group (CN: 1.1 ± 0.1 $\mu\text{g/mL}$) (figure 2). EHG at the doses of 100 ($38.8 \pm 2.7\%$) and 200 mg/kg ($26.5 \pm$

0.8%), administered orally before the marker, decreased the intestinal transit when compared with the control group (CN: $52.54 \pm 3.3\%$), as shown in Figure 3.

4 DISCUSSION

The antiulcerogenic activity of the hydroalcoholic extract of the geopropolis (EHG) of *Melipona fasciculata*, known as “Tiúba”, cultivated in the Cerrado of Maranhão, was evaluated through acute ulcer models, parameters of gastric secretion and the determination of gastric emptying and intestinal transit.

The chemical composition of the geopropolis evaluated in this study was recently demonstrated by Dutra et. al. (2014), who showed the presence of compounds of the phenolic acids, triterpenes and hydrolysable tannins classes. These compounds, which are also present in other plant species, have been associated with various pharmacological activities in the digestive system (AL-SAIED and NAGA, 2014; VIJAYAKUMAR et al, 2016), a fact that motivated us to investigate the antiulcerogenic effect of the EHG of *Melipona fasciculata*.

Ethanol is a necrotizing agent of gastric mucosa, used in models to evaluate antiulcerogenic activity because of its ability to dissolve the constituents of the mucus in the stomach, leaving the mucosa directly in contact with the acid, harming the cells of the mucosa. These effects are due to an increase in lipid peroxides and free radicals derived from oxygen that cause membrane damage, cell death, exfoliation, and epithelial erosion (BIRDANE et al., 2007; RIBEIRO-JUNIOR et al., 2015).

EHG at the doses of 50 and 100 mg/kg decreased the ethanol-induced ulcerated area of the stomach. The effect of the geopropolis extract was dependent on dose. The histopathological analysis performed in the stomachs of the animals,

revealed that the gastric mucosa showed no significant changes in the two doses tested.

The antiulcerogenic effect of EHG is likely due to the antioxidant properties of the geopropolis. Dutra et al (2014) demonstrated the antioxidant activity of the geopropolis of *M. fasciculata*, associating this effect to the high concentration of phenolic acids found in its hydroalcoholic extract. The antioxidant activity is important since free radicals are a determinant factor for the formation of ulcerative and erosive lesions in the gastrointestinal tract (BORRELLI; IZZO, 2000). In this respect, it is also known that ethanol-induced lesions are not inhibited by antisecretory agents, but rather by substances that activate the cytoprotective mechanisms of the gastric mucosa, such as prostaglandins, and the production of mucus and bicarbonate (TAKAYAMA et al., 2011).

Another ulcerogenic agent used in models of gastric mucosal lesion induction is indomethacin, a drug that belongs to the group of anti-inflammatory drugs (NSAIDS). NSAIDS are known to induce peptic ulcers during anti-inflammatory therapy, especially after long term use. These drugs induce gastric ulcers by inhibiting the synthesis of prostaglandins resulting from the blockage of the cyclooxygenase (COX) enzyme (SOSTRES et al., 2010). The inhibition of prostaglandin synthesis increases acid production and reduces the formation of cytoprotective mucus, which may induce gastrointestinal ulceration (NGUELEFACK et al., 2008).

In this model of ulceration, EHG also significantly reduced mucosal injuries. This may have been due to interference with the production of prostaglandins by phenols found at high concentrations in tiúba geopropolis (DUTRA, 2012). Study have associated phenols with increased synthesis of prostaglandins due to their

action as a substrate for peroxidase, which converts PGG₂ to PGH₂. These are subsequently transformed by enzymatic reactions into stable products such as series 2 prostaglandins (PGE₂ and PGI₂). They inhibit stomach acid secretion stimulated by feeding, histamine, proton pump or gastrin. Furthermore, the secretion of mucus in the stomach and small intestine is increased by PGE₂, which contributes to maintain mucosal integrity (ALANKO et al., 1999).

The geopropolis is a product obtained from the vegetable resins of the local flora visited by the bees (CARDOZO et al, 2015). The geopropolis of the cerrado of Maranhão is rich in phenolic acids, tannins and flavonoids (DUTRA, 2014). Plants rich in flavonoids and tannins have been traditionally used for the treatment of gastric ulcers, mainly because of their anti-inflammatory (KARKHANEH et al., 2016), antioxidant (PINHO et al., 2016) and adstringent effects (ROMANUCCI et al., 2016). In gastric ulcers, tannins react with tissue proteins to form a protective layer on the damaged epithelium of the stomach, ellagitannins are a class of polyphenolic compounds with clearly evident pharmacological effects, including potent inhibitory activity against free radicals (DE JESUS et al., 2012), inhibitory effects on lipid peroxidation (SANGIOVANNI et al., 2013), and gastroprotective properties (AL-SAIED and EL-NAGA, 2014). Flavonoids are antioxidants compounds that efficiently remove superoxide anions and hydroxyl, peroxy and alcoxil radicals (MOTA et al., 2011), contributing to the antiulcerogenic effect of natural products (BOLIGON et al., 2014; ATEUFACK et al., 2015).

The antiulcer activity of EHG observed in the models described above led us to evaluate the antisecretory activity. We verified the influence of EHG on the parameters (volume, pH and total acidity) of gastric secretion. The gastroprotective effect of EHG was investigated through the pylorus ligation model, which evaluates

secretion parameters, such as gastric pH and volume. This test showed that the geopropolis extract reduced the gastric volume at a dose of 200 mg/kg, in addition to producing changes in the total acidity.

Gastrointestinal motility dysfunction is one of the main causes of various diseases of the GIT, including functional dyspepsia (FD) and gastroesophageal reflux disease (GERD), which, in turn, is pathophysiologically related to various causes, including reduced gastrointestinal emptying and transit, Impaired gastric accommodation, visceral hypersensitivity, genetic factors, stress and inflammation (NAM et al., 2016). In this study, EHG significantly decreased the effect on the intestinal transit when compared to the control group, using as standard drug atropine, competitive antagonist of muscarinic cholinergic receptors (TYAGI et al., 2016), there may be some relationship of EHG action with that drug.

In our study, therefore, the hydroalcoholic extract of the geopropolis of *Melipona fascicula* from the Cerrado of Maranhão has a gastroprotective effect, validating its popular use, with similar effects as standard drugs, probably due to the phenolic compounds present in its composition. Other studies should be conducted to reveal the antiulcerogenic action mechanisms of EHG.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank FAPEMA and CNPQ for the financial support.

REFERENCES

- Abreu BVB, Dutra RP, Batista MCA, Azevedo, CC, Nogueira AMC, Costa MCP, et al. 2006. Polifenóis de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith coletado no Cerrado maranhense. *Revista de Ciências da Saúde* 8, 18-24.
- Akca A, Akca G, Topçu F, Macit, E, Pıkdöken, L, Özgen, I. 2016. The Comparative Evaluation of the Antimicrobial Effect of Propolis with Chlorhexidine against Oral Pathogens: An In Vitro Study. *Biomed Research International*. United States, 3627463, 2016. doi: 10.1155/2016/3627463.
- Alanko J, Riutta A, Holm P, Mucha I, Vapaatalo H, Metsä-Ketelä T. 1999. Modulation of arachidonic acid metabolism by phenols: relation to their structure and antioxidant/prooxidant properties. *Free Radical Biology and Medicine*, 26: 193-201.
- Al-Qaraghuli AMS, Abdel Wahab EMN, Al-Ani IM, Faisal GG. 2013. Effects of Xiang Sha Yang Wei Wan on Ethanol-Induced Gastric Ulcer in Sprague Dawley Rats: a Histological Study. *International Medical Journal Malaysia*, 12(2): 3-10.
- Al-Saied E, El-Naga R. 2014. Protective role of ellagitannins from *Eucalyptus citriodora* against ethanol-induced gastric ulcer in rats: Impact on oxidative stress, inflammation and calcitonin-gene related peptide. *Phytomedicine*, 22 (1): 5-15. doi: 10.1016/j.phymed.2014.10.002.
- Ateufack G, Domgnim Mokam EC, Mbiantcha M, Dongmo Feudjio RB, David N, Kamanyi A. 2015. Gastroprotective and ulcer healing effects of *Piptadeniastrum Africanum* on experimentally induced gastric ulcers in rats. *BMC Complement Altern Med*, 15:214. doi: 10.1186/s12906-015-0713-5.
- Barros MP, Lemos M, Maistro EL, Leite MF, Sousa JPB, Bastos, JK. et al. 2008. Evaluation of antiulcer activity of the main phenolic acids found in Brazilian Green Propolis. *Journal of Ethnopharmacology*, 120(3), p.372-377. doi: 10.1016/j.jep.2008.09.015.
- Birdane FM, Cemek M, Birdane YO, Gülçin I, Büyükkokuroğlu, ME. 2007. Beneficial effects of *Foeniculum vulgare* on ethanol-induced acute gastric mucosal injury in rats. *World Journal of Gastroenterology*, 13: 607-611.
- Boligon AA, de Freitas RB, de Brum TF, Waczuk EP, Klimaczewski CV, de Ávila DS, Athayde ML, de Freitas Bauermann L. 2014. Antiulcerogenic activity of *Scutia buxifolia* on gastric ulcers induced by ethanol in rats. *Acta Pharm Sin B*. 4 (5):358-67. doi: 10.1016/j.apsb.2014.05.001.
- Borrelli F, Izzo AA. 2000. The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies. *Phytotherapy Research*, 14: 581-591.
- Cardozo, DV, Mokochinski, JB, Schineider, CM, Sawaya, ACHF, Caetano, IK, Felsner, M L, Torres, YR. 2015. Variabilidade Química de Geoprópolis Produzida pelas Abelhas sem Ferrão Jataí, Mandaçaia e Mandurí. *Rev. Virtual Quim.* 7 (6), 2457-2474.

Chan GC, Cheung KW, Sze DMY. 2013. The Immunomodulatory and Anticancer Properties of Propolis. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*. 44, 3, 262-273. doi: 10.1007/s12016-012-8322-2.

Cinegaglia NC, Bersano PRO, Araújo MJAM, Búfalo MC, Sforcin JM. 2013. Anticancer Effects of Geopropolis Produced by Stingless Bees on Canine Osteosarcoma Cells In Vitro. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 737386, 6. doi: 10.1155/2013/737386.

Coelho GR, Mendonca RZ, Vilar KD, Figueiredo CA, Badari JC, Taniwaki N. 2015. Antiviral Action of Hydromethanolic Extract of Geopropolis from *Scaptotrigona postica* against Antih herpes Simplex Virus (HSV-1). *Evidence-Based Complementary And Alternative Medicine*, 296086, 10. doi: 10.1155/2015/296086.

Coruzzi G, Scarpignato C, Zappia L, Bertaccini G. 1980. Effect of benzquinamide on gastrointestinal motility. *Farmaco Prat*. 35(9):466-72.

Da Cunha MG, Franchin M, Galvão LCC, De Ruiz ALTG, De Carvalho JE, Ikegaki M, et al. 2013. Antimicrobial and antiproliferative activities of stingless bee *Melipona scutellaris* geopropolis. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13:23. doi: 10.1186/1472-6882-13-23.

Da Cunha MG, Franchin M, Galvão LCC, Bueno-Silva B, Ikegaki M, De Alencar SM, et al. 2013. Apolar Bioactive Fraction of *Melipona scutellaris* Geopropolis on *Streptococcus mutans* Biofilm. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 256287, 7. doi: 10.1155/2013/256287.

De Barros MP, Lemos M, Maistro EL, Leite MF, Sousa JPB, Bastos JK, et al. 2008. Evaluation of antiulcer activity of the main phenolic acids found in Brazilian Green Propolis. *Journal of Ethnopharmacology*. 120, 3, 372-377. doi: 10.1016/j.jep.2008.09.015.

De Jesus NZT, Falcão HDS, Gomes IF, Leite TJA, Lima GRM, Barbosa-Filho, JM, et al 2012. Tannins, peptic ulcers and related mechanisms. *Int. J. Mol. Sci*. 13, 3203–3228. doi: 10.3390/ijms13033203.

De Souza SA, Camara, CA, Da Silva, EMS, Silva, TMS. 2013. Composition and Antioxidant Activity of Geopropolis Collected by *Melipona subnitida* (Jandaíra) Bees. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 801383, 5. doi: 10.1155/2013/801383.

Djahanguiri B. 1969. The production of acute gastric ulceration by indomethacin in the rat. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 4, p. 265.

Dutra RP, Abreu BVB, Cunha MS, Batista MCA, Torres LMB, Nascimento FRF, et al. 2014. Phenolic acids, hydrolyzable tannins, and antioxidant activity of geopropolis from the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 2549–2557. doi: 10.1021/jf404875v.

Dutra RP, Nogueira AMC, Marques RRO, Costa MCP, Ribeiro MNSR. 2008. Avaliação farmacognóstica de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith da Baixada maranhense, Brasil. *Braz J. Pharmacogn.* 18(4).

Fisher AA, Le Couteur DG. 2001. Nephrotoxicity and hepatotoxicity of histamine H2 receptor antagonists. *Drug Safety*, 24: 39-57.

Fock KM, Katelaris P, Sugano K, Ang TL, Hunt R, Talley NJ, Lam SK, Xiao SD, Tan HJ, Wu CY, Jung HC, Hoang BH, Kachintorn U, Goh KL, Chiba T, Rani AA. 2009. Second Asia-Pacific Consensus Guidelines for *Helicobacter pylori* infection. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 24, 10, pp 1587–1600. doi: 10.1111/j.1440-1746.2009.05982.x.

Franchin M, Da Cunha MG, Denny C, Napimoga MH, Cunha TM, Koo H, et al. 2012. Geopropolis from *Melipona scutellaris* decreases the mechanical inflammatory hypernociception by inhibiting the production of IL-1b and TNF-a. *Journal of Ethnopharmacology* 143, 709–715.

Franchin M, Da Cunha MG, Denny C, Napimoga MH, Cunha TM, Bueno-Silva B, et al. 2013. Bioactive Fraction of Geopropolis from *Melipona scutellaris* Decreases Neutrophils Migration in the Inflammatory Process: Involvement of Nitric Oxide Pathway. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 907041, 9. doi: 10.1155/2013/907041.

Franchin M, Cólón DF, Castanheira FVS, Da Cunha MG, Bueno-Silva B, Alencar SM, et al. 2016. Vestitol Isolated from Brazilian Red Propolis Inhibits Neutrophils Migration in the Inflammatory Process: Elucidation of the Mechanism of Action. *Journal of Natural Products Article ASAP*.

Gonzalez P, Soriano V, López P, Niveiro E. 2002. Anaphylaxis to proton pump inhibitors. *Allergologia et Immunopathologia*, 30: 342-343.

Kannan MM, Quine, SD. 2011. Ellagic acid ameliorates isoproterenol induced oxidative stress: Evidence from electrocardiological, biochemical and histological study. *European Journal of Pharmacology* 659, 45–52.

Karkhaneh L, Yaghmaei P, Parivar K, Sadeghizadeh M, Ebrahim-Habibi A. 2016. Effect of trans-chalcone on atheroma plaque formation, liver fibrosis and adiponectin gene expression in cholesterol-fed NMRI mice. *Pharmacol Rep.*, 68 (4): 720-727. doi: 10.1016/j.pharep.2016.03.004.

Kerr W. 1987. Abelhas indígenas brasileiras (meliponíneos) na polinização e na produção de mel, pólen, geoprópolis e cera. *Inf. Agropec* 13: 15-27.

Kocak MS, Sarikurkcu C, Cengiz M, Kocak S, Uren MC, Tepe B. 2016. *Salvia cadmica*: Phenolic composition and biological activity. *Industrial Crops and Products*, 85, pp.204-212. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.12.019.

Kolentinis MK, Verginadis II, Simos YV, Tisitou NC, Karkabounas SC, Kolettis TM, et

al. 2013. Cardiovascular effects of vanillylmandelic acid in rats. *European Journal of Pharmacology*, 703, 1–3, 5 p. 46-52. doi: 10.1016/j.ejphar.2013.01.044.

Komosinska-Vassev K, Olczyk P, Kaźmierczak J, Mencner L, Olczyk K. 2015. Bee Pollen: Chemical Composition and Therapeutic Application. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 297425, 6. doi: 10.1155/2015/297425.

Morimoto Y, Shimohara K, Oshima S, Sukamoto T. 1991. Effects of the new anti-ulcer agent KB-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of teprenone and cimetidine. *Japanese Journal of Pharmacology*, 57, 495–505.

Mota, CS, Freitas, RB, Athayde, ML, Boligon, AA, Augusti, P, Somacal, S. 2011. Effect of *Vernonia cognata* on oxidative damage induced by ethanol in rats. *Hum Exp Toxicol*, 30 (2011), pp. 675–684. doi: 10.1177/0960327110377646.

Nam, Y, Lee, JM, Wang, Y, Ha, HS, Sohn, UD. 2016. The effect of Flos *Lonicerae japonicae* extract on gastro-intestinal motility function. *J Ethnopharmacol*. 179:280-90. doi: 10.1016/j.jep.2015.12.056.

Nguelefack TB, Feumebo CB, Ateufack G, Watcho P, Tatsimo S, Atsamo AD, Tane P, Kamanyi A. 2008. Anti-ulcerogenic properties of the aqueous and methanol extracts from the leaves of *Solanum torvum* Swartz (Solanaceae) in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 119: 135-140. doi: 10.1016/j.jep.2008.06.008.

Nieva Moreno MI, Isla MI, Cudmani NG, Vattuone MA, Sampietro AR. 1999. Screening of antibacterial activity of Amaicha del Valle (Tucuma´ n, Argentina) propolis. *Journal of Ethnopharmacology*, 68, 97–102.

Nina N, Quispe CQ, Jiménez-Aspee F, Theoduloz C, Giménez A, Schamedahirschmann, Guillermo S. 2016. Chemical profiling and antioxidant activity of Bolivian propolis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 96, 6, p. 2142–2153. doi: 10.1002/jsfa.7330.

Okuda T. 2005. Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. *Phytochemistry*, 66, 2012–2031

Pinho FV, da Cruz LC, Rodrigues NR, Waczuk EP, Souza CE, Coutinho HD, da Costa JG, Athayde ML, Boligon AA, Franco JL, Posser T, de Menezes IR. 2016. Phytochemical Composition, Antifungal and Antioxidant Activity of *Duguetia furfuracea* A. St.-Hill. *Oxid Med Cell Longev*. 2016:7821051. doi: 10.1155/2016/7821051.

Ra A, Tobe SW. 2004. Acute interstitial nephritis due to pantoprazole. *Journal Annals of Pharmacotherapy*, 38: 41-45.

Ribeiro-Junior JA, Franchin M, Cavallini ME, Denny C, De Alencar SM, Ikegaki M, et al. 2015. Gastroprotective Effect of Geopropolis from *Melipona scutellaris* Is Dependent on Production of Nitric Oxide and Prostaglandin. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 459846, 5 p. doi:

10.1155/2015/459846.

Robert A, Nezamis JE, Lancaster C, Hanchar AJ. 1979. Cytoprotection by prostaglandins in rats: Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl and thermal injury. *Gastroenterology*, v. 77, p. 433-443.

Romanucci V, D'Alonzo D, Guaragna A, Di Marino C, Davinelli S, Scapagnini G, Di Fabio G, Zarrelli A. 2016. Bioactive Compounds of *Aristotelia chilensis* Stuntz and their Pharmacological Effects. *Curr Pharm Biotechnol*, 17(6): 513-23.

Sangiovanni E, Vrhovsek U, Rossoni G, Colombo E, Brunelli C, Brembati L, et al. 2013. Ellagitannins from Rubus berries for the control of gastric inflammation: in vitro and in vivo studies. *PLoS ONE* 8, e71762. doi: 10.1371/journal.pone.0071762.

Saravanakumar M, Raja B. 2011. Veratric acid, a phenolic acid attenuates blood pressure and oxidative stress in L-NAME induced hypertensive rats. *European Journal of Pharmacology*, e 671, 1–3, 5 p. 87-94. doi: 10.1016/j.ejphar.2011.08.052.

Shanthakumar J, Karthikeyan A, Bandugula VR, Prasad, NR. 2012. Ferulic acid, a dietary phenolic acid, modulates radiation effects in Swiss albino mice. *European Journal of Pharmacology*, 691, 1–3, 15, p.268-274. doi: 10.1016/j.ejphar.2012.06.027.

Sostres C, Gargallo CJ, Arroyo MT, Lanás A. 2010. Adverse effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs, aspirin and coxibs) on upper gastrointestinal tract. *Best Practice and Research. Clinical Gastroenterology*, 24: 121–132. doi: 10.1016/j.bpg.2009.11.005.

Stickney JC, Northup, DW. 1959. Effect of gastric emptying upon propulsive motility of small intestine of rats. *Proc Soc Exp Biol Med*.101(3):582-3.

Takayama C, de-Faria FM, de Almeida AC, Valim-Araújo Dde A, Rehen CS, Dunder RJ, Socca EA, Manzo LP, Rozza AL, Salvador MJ, Pellizzon CH, Hiruma-Lima CA, Luiz-Ferreira A, Souza-Brito AR. 2011. Gastroprotective and ulcer healing effects of essential oil from *Hyptis spicigera* Lam. (Lamiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 135:147–155. doi: 10.1016/j.jep.2011.03.002.

Tyagi P, Mandal MB, Gangopadhyay AN, Patne SC. 2016. A functional study on small intestinal smooth muscles in jejunal atresia. *J Indian Assoc Pediatr Surg*. 21(1):19-23. doi: 10.4103/0971-9261.

Tlili N, Tlili H, Mejri F, Anouer E, Saadaoui A, Khaldi N. 2015. Phenolic profile and antioxidant activity of *Capparis spinosa* seeds harvested from different wild habitats. *Ind. Crops Prod.*, 76, pp. 930–935

Vargas AC, Loguercio AP, Witt NM, Da Costa MM, Silva MS, Viana LR. 2004. Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcoólico de própolis. *Ciência Rural*, 34: 159-163.

Vargas- Sánchez RD, GR, Torrescano-Urrutia EAF, Carvajal-Millán E, González-

Córdova AF, Vallejo-Galland B, Torres-Llanez MJ, et al. 2014. Antioxidant and Antimicrobial Activity of Commercial Propolis Extract in Beef Patties. *Journal of Food Science*. 79, 8, p. 1499–1504.

Visscher FE, Seay PH, Tazelaar, AP, Veldkamp W, Vander Brook MJ. 1954. Pharmacology of pamine bromide. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutic*, 110, p. 188-204.

Vijayakumar AR, Daniel EP, Ilavarasan R, Venkataraman S, Vijayakumar S. 2016. Ulcer Protective Activity of *Jatropha gossypifolia* Linn. in Wistar Rats. *Pharmacognosy Res*, 8 (Suppl 1):S61-6. doi: 10.4103/0974-8490.178640.

Yang LL, Lee CYL, Yen, KY. 2000. Induction of apoptosis by hydrolyzable tannins from *Eugenia jambos* L. on human leukemia cells. *Cancer Letters* 157, 65-75.

Yildirim A, Duran GG, Duran N. 2016. Antiviral Activity of Hatay Propolis Against Replication of Herpes Simplex Virus Type 1 and Type 2. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 22:422-430.

Zlabek JA, Anderson CG. 2002. Lansoprazole-induced thrombocytopenia. *Journal Annals of Pharmacotherapy*, 36: 809-811.

Table 1. Effects of hydroalcoholic extract of the geopropolis of *Melipona fasciculata* Smith (EHG) on ethanol-induced ulcers in mice.

Treatment	Dose (mg/kg)	Ulcerated area (mm²)	Reduction of ulcerated area (%)
Control	---	127.7 ± 9.5	---
pantoprazole	40	41.9 ± 6.5*	67.2
EHG	50	42.7 ± 6.7*	66.6
EHG	100	8.6 ± 2.6*#	93.2

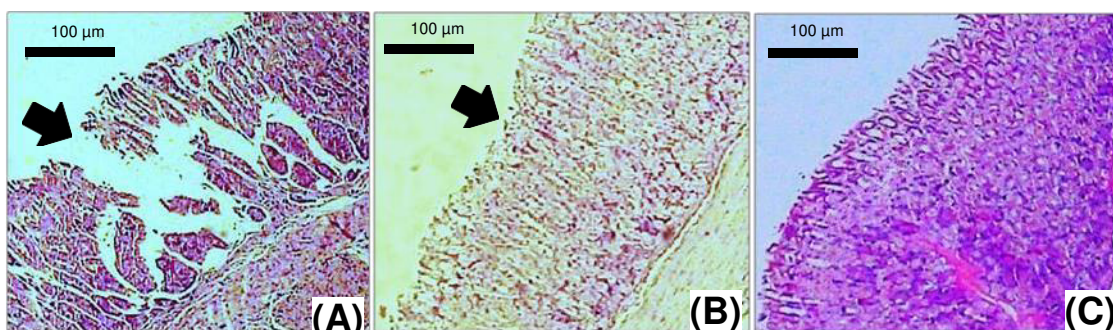
Statistical Analysis: ANOVA, followed by Tukey's test. The results indicate the mean ± standard error of mean (n = 6/group). *p<0.05 vs. Control group. #p<0.05 vs. pantoprazole

Table 2. Effects of hydroalcoholic extract of the geopropolis of *Melipona fasciculata* Smith (EHG) on indomethacin-induced ulcers in mice.

Treatment	Dose (mg/kg)	Ulcerated area (mm²)	Reduction of ulcerated area (%)
Control	---	119.3 ± 24.2	---
pantoprazole	40	46.2 ± 0.6*	61.2
EHG	50	20.4 ± 3.9*	82.9
EHG	100	8.9 ± 2.0*	92.5

Statistical Analysis: ANOVA, followed by Tukey's test. The results indicate the mean ± standard error of mean (n = 6/group). *p<0.05 vs. Control group.

Figure 1. Photomicrograph of the stomachs of Swiss mice that received ethanol as pathogenic agent.



Lesions in the gastric mucosa caused by ethanol in mice pre-treated with saline (A); intact mucosa of the animals pretreated with EHG 50 mg/Kg (B) and EHG 100 mg/Kg (C). (Hematoxylin/ Eosin coloring; 100x magnification). The arrows indicate desquamated areas of the epithelium or mucosa.

Table 3. Effect of hydroalcoholic extract of the geopropolis of *Melipona fasciculata* (EHG) on gastric secretion of rats after pylorus ligation.

Treatment	Dose (mg/kg)	Volume (mL)	pH (Units)	Total Acidity [H ⁺] mEq/L
Control	---	3.95 ± 0.16	2.73 ± 0.23	19.25 ± 3.70
Omeprazole	20	2.25 ± 1.18*	4.60 ± 0.35*	7.50 ± 2.06*
EHG	100	3.20 ± 0.40	2.89 ± 0.15	12.50 ± 2.36*
EHG	200	2.90 ± 0.20*	3.89 ± 0.16	9.70 ± 0.76*

Statistical Analysis: ANOVA, followed by Tukey's test. The results indicate the mean ± standard error of the mean (n = 5/group). *p<0.05 vs. Control group.

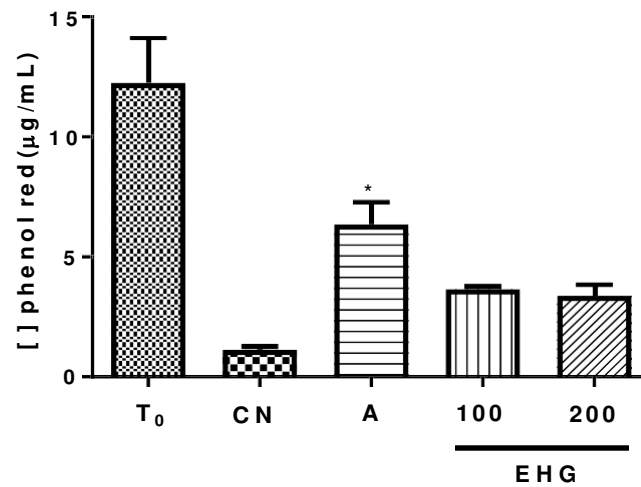


Figure 2. Effect of hydroalcoholic extract of the geopropolis of *Melipona fasciculata* (EHG) on gastric emptying after 20 min ingestion of the marker. The animals were given a CN (control, p.o.), atropine (A) and EHG (100 or 200 mg/kg p.o.). The results are expressed as mean \pm standard error of the mean (n = 6/group). The difference between the groups was determined by one-way ANOVA, followed by Tukey's test. *p<0.05 vs. Control group (CN).

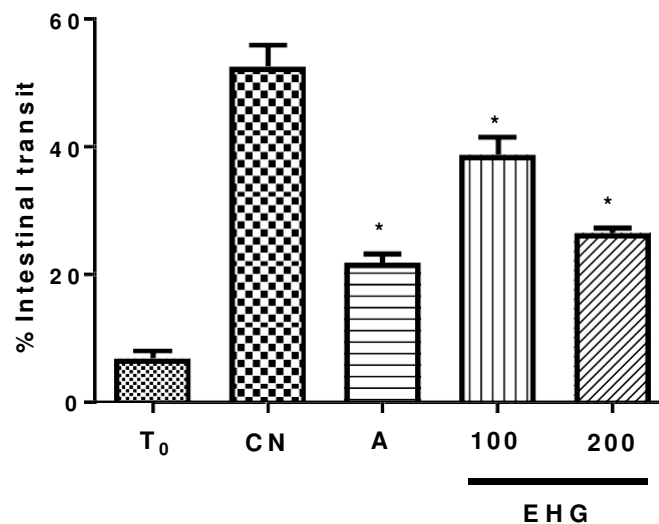


Figure 3. Effect of hydroalcoholic extract of the geopropolis of *Melipona fasciculata* (EHG) on intestinal transit after 20 min ingestion of the marker. The animals were given a CN (control, p.o.), atropine (A) and EHG (100 or 200 mg/kg p.o.). The results are expressed as mean \pm standard error of the mean (n = 6/group). The difference between the groups was determined by one-way ANOVA, followed by Tukey's test. *p<0.05 group vs. negative control (CN).

Capítulo II

6. CAPÍTULO II

Artigo a ser submetido ao periódico *Journal of Ethnopharmacology*

(ISSN: 0378-8741)

Fator de impacto: 2.998

Qualis: B1 (Biotecnologia – 2014)

“Gastroprotective mechanisms of action of geopropolis from *Melipona fasciculata* Smith”

Gastroprotective mechanisms of action of geopropolis from *Melipona fasciculata* Smith

Débora Luana Ribeiro Pessoa^a, Marilene Oliveira da Rocha Borges^{a*}

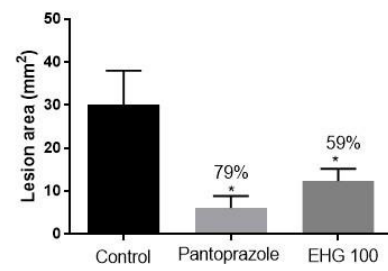
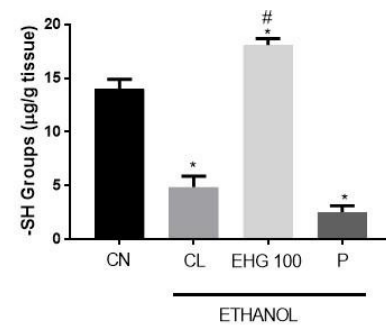
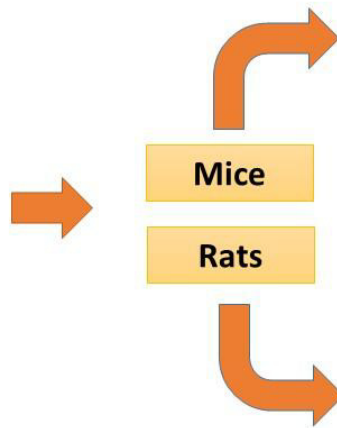
^aDepartamento de Ciências Fisiológicas, Laboratório de Pesquisa e Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Maranhão.

* Corresponding author at: Universidade Federal do Maranhão, Campus Universitário Dom Delgado, Avenida dos Portugueses, 1966, Bacanga - CEP 65080-805, São Luís – Maranhão, Brasil. Tel.: +55 98 32728533
E-mail: rocha.marilene@ufma.br (M.O.R. Borges)

Graphic Abstract



EHG 100 mg/Kg
Melipona fasciculata



Abstract

Ethnopharmacological Relevance: Geopropolis produced by *Melipona fasciculata* Smith, a stingless bee native from the state of Maranhão, Brazil, is used by the local population to treat digestive disturbances and other pathologies.

A previous study demonstrated the antiulcer action EHG in induction models by ethanol and indomethacin.

Aims: To investigate the mechanisms of action involved in the gastroprotective and healing activities of the hydroalcoholic lyophilized extract (EHG) of geopropolis from *Melipona fasciculata* Smith.

Material and methods: To characterize the mechanisms of action were determined, the effect of EHG on gastric mucus production, as well as, the involvement of nitric oxide (NO) and non-protein sulfhydryl groups (-SH groups) and of non-protein sulfhydryl groups in Swiss mice. The healing capacity of EHG was evaluated using the 30% acetic acid-induced chronic ulcer model, histopathological and immunohistochemical analysis.

Results: An increase in gastric mucus production was verified in the animals treated with EHG. Groups pre-treated with NEM, an inhibitor of sulfhydryl compounds, showed a decrease of 34.54% on the EHG gastroprotective activity, while pre-treatment with L-NAME, an NO synthesis inhibitor, showed no effect on the extract activity. Oral treatment with EHG (100 mg/kg) was able to revert the reduction of the in levels of sulfhydryl groups in the gastric mucosa, restoring the antioxidant system ($18.0 \pm 0.6 \mu\text{g/g}$). EHG reduced the lesions of acid acetic-induced ulcer in 59%. Immunohistochemical investigation showed strong reactivity (+++) and a large amount of COX -2 and low reactivity (+) for Ki -67 in the gastric mucosa of animals treated EHG.

Conclusion: (EHG) presents the involvement of non-protein sulfhydryl groups related gastroprotective activity, in addition to the increase in gastric mucus production. Furthermore, EHG has a healing action on the gastric mucosa.

Keywords: Geopropolis; *Melipona fasciculata*; antiulcerogenic activity; peptic ulcer; gastroprotective activity.

1. Introduction

Peptic ulcer is one of the causes of dyspepsia, which is any symptom of the upper gastric tract, including epigastric pain, heartburn, reflux, nausea, vomiting and discomfort (Ford et al., 2016), and considered a clinical condition with annual incidence of 25% to 40% (Robinson and Perkins Jr, 2016). The healthcare quality depends on a wide range of factors, including adequate diagnosis and prescription of medication, its adequate administration considering the necessary time and costs with therapy (Patel and Dhande, 2016), which play a key role on the peptic ulcer treatment given the treatment limitations and the incidence of side effects (Gurusamy and Pallari, 2016; Vijayakumar et al., 2016).

Geopropolis is a special kind of propolis presented as a mixture of vegetal resins, wax and earth or clay (De Souza et al., 2013). *Melipona fasciculata* Smith is a stingless bee, native from the state of Maranhão, Brazil that produces honey and geopropolis well accepted by the local population, adding market value to the products (Dutra et al., 2008).

Several pharmacological activities of the Maranhão geopropolis have been reported in the last years. Studies using the geopropolis extract showed antibacterial activity on the oral cavity of young patients, suggesting the product can be an alternative in caries prevention (Duailibe, Gonçalves and Ahid, 2007). Moreover, Libério et al. (2011) observed that the gel preparation of geopropolis has antimicrobial action against biofilms of *S. mutans* and *C. albicans* in the oral cavity.

Other effects have been demonstrated in experimental models such as antioxidant (De Souza et al., 2013; Dutra et al., 2014), antineoplastic (Cinegaglia et al., 2013; Da Cunha et al., 2016), anti-inflammatory (Franchin et al., 2012; Franchin et al., 2013) and antiviral (Coelho et al., 2015). Only one study approach the gastrointestinal activity of the geopropolis in the literature. Ribeiro-Junior et al. (2015) evaluated the gastroprotective activity of geopropolis from *Melipona scutellaris*, from

the state of Bahia, Brazil, and showed a reduction on the ethanol-induced gastric lesions and the involvement of nitric oxide and prostaglandins in the activity of the extract.

Regarding the chemical composition of geopropolis, Bankova et al. (1998) identified more than fifty compounds, mainly phenolic and terpenic on the Brazilian geopropolis produced by the species *Melipona compressipes*, *Melipona quadrifasciata anthidioides* and *Tetragona clavipes*. Chemical analysis of the hydroalcoholic extract of geopropolis from *Melipona fasciculata*, native from Maranhao, showed eleven compounds belonging to the class of phenolic acids and hydrolyzable tannins (gallotannins and ellagitannins), with high antioxidant activity (Dutra et al., 2014). The aim of this work was to evaluate the possible mechanisms of action involved in the gastroprotective and healing activities of the hydroalcoholic lyophilized extract (EHG) of geopropolis from *Melipona fasciculata* Smith.

2. Material and methods

2.1 Drugs and reagents

The following substances were used in the study: carbenoxolone, L-NAME (N-G-nitro-L-arginin), NEM (N-ethylmaleimide), alcian blue, pantoprazole and (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), acetic acid, absolute ethanol, Sodium Chloride, and formaldehyde (Merck, Darmstadt, Germany), xylazine and ketamine (CEVA, Paulínia, Brazil). All medications and reagents were prepared immediately before use.

2.2 Preparation of hydroalcoholic lyophilized extract (EHG) of geopropolis

The geopropolis from *Melipona fasciculata* Smith was collected from inside the hive, using sterilized spatulas, from a meliponarium located in the city of Fernando Falcão (6°7'30"S 44°52'30"W), southeast region of Maranhão, in November of 2008.

The collected material was then placed in sterilized amber flasks and kept under refrigeration (4 °C).

Geopropolis *in natura* was powdered with a knife-type grinder and the powder (500 g) was macerated with 70% ethanol, in the ratio 1:2 (w/v) for 48 h. The resulting extractive solution was filtered to remove earth and concentrated in a rotary evaporator under reduced pressure and 40°C, resulting in the hydroalcoholic lyophilized extract (EHG) (Dutra et al., 2008), with 8.8% yield.

2.3 Animals

Wistar rats (*Rattus norvegicus*) weighting 200-300g, and Swiss mice (*Mus musculus*), weighting 20–35g, adults, males and females obtained at the Animal Care Center of University Federal of Maranhão, Brazil. They were kept under standard environmental (12 h light/dark cycle) and temperature cycle conditions (22 ± 2 °C). Food (Purina, Brazil) and water were available *ad libitum*. The experimental protocols were submitted to and approved by the Ethics Committee on Animal Use of UFMA, in accordance with COBEA (Brazilian College of Animal Experimentation) under licence number 09/14. In all protocols the animals were euthanized in a CO₂ chamber.

2.4 Experimental groups

The hydroalcoholic lyophilized extract (EHG) from *Melipona fasciculata* Smith was dissolved in 0.9% NaCl solution prior to its administration. For each experimental model, the animals were randomly divided into three groups: 1) negative control group, administered 0.9% NaCl, 2) positive control group, administered pantoprazole 40 mg/kg (a proton pump inhibitor) or carbenoxolone 100 mg/kg (a cytoprotective agent) depending on the experimental model and 3) EHG administered group, at the dosage of 100 mg/kg. This dosage was chosen as the most efficient based in previous protocols to performed by our group (acute ulceration, gastrointestinal motility and antisecretory activity, data not yet published). Prior to experiments, the animals were fasted and kept in elevated floor cages with large grid mesh bases to avoid coprophagy.

2.5 Gastric mucus determination

Gastric mucus determination following the method described by Corne et al. (1974) modified method. After 16 h fasting (water *ad libitum*), the mice were separated in three groups (n = 6) and orally treated with 0.9% NaCl solution, 0.1 mL/10g (control group), carbenoxolone (100 mg/kg) or EHG (100 mg/kg). One hour later, the animals were euthanized and their stomach glandular tissue was removed, weighted and kept for 2 h in test tubes with 5 mL of 1% Alcian Blue solution (prepared with 0.16 mol/L sucrose solution in 0.05 mol/L sodium acetate and pH adjusted to 5.8 with 0.1 mol/L HCl). The excess of Alcian Blue was removed with two successive washings with 5 mL of 0.25 mol/L sucrose solution, first for 15 min and then for 45 min. The dye complexed with the glandular wall mucus was extracted in 5 mL of magnesium chloride (0.5 mol/L) and intermittently shaken for 1 min every 30 min for 2 h. The blue supernatant was added to 5 mL of ethyl ether and vigorously shaken till emulsion is obtained. Emulsion was then centrifuged at $1550 \times g$ for 10 min. The aqueous phase was separated and the residue was discarded. The sample absorbance was read at a spectrophotometer (598 nm) and the results were plotted on an standard curve of Alcian Blue and expressed in μg of Alcian Blue/g of glandular tissue.

2.6 Involvement of nitric oxide (NO) and non-protein sulfhydryl groups (-SH groups) in gastroprotective effect of EHG

Mice fasted for 16 h were distributed in 9 groups (n = 6). Three groups were pre-treated with 0.9% NaCl solution intraperitoneally (i.p), three groups with L-NAME (N-G-nitro-L-arginine, 70 mg/kg, i.p), an NO-synthase inhibitor, and three groups pre-treated with NEM (N-ethylmaleimide, 10 mg/kg, i.p), a sulfhydryl group blocker (Matsuda, Li, Yoshikawa, 1999; Arrieta et al., 2003). Thirty minutes after pre-treatment, the animals were orally administered 0.9% NaCl solution (control), carbenoxolone (100 mg/kg) or EHG (100 mg/kg). One hour later, all animals received 1 mL of 75% ethanol (orally) to induce gastric lesions. One hour after administration

of the damaging agent, animals were euthanized in CO₂ chamber and their stomachs were removed and photographed for the assessment of the gastric lesions. The gastric lesion surface area was determined by computerized planimetry (ImageJ® Launcher Software) and the results expressed in mm².

2.7 Quantification of non-protein sulfhydryl groups (–SH groups).

The quantification of non-protein sulfhydryl groups was performed with the homogenate of the gastric mucosa of animals with ethanol-induced ulcers. After fasting for 16 h, the animals were divided into four groups (n = 5) and treated orally with 0,9% NaCl solution (CL, injured control), pantoprazole (40 mg/kg) or EHG (100 mg/kg) 1 h before the administration of the ulcerogenic agent. Gastric lesions were induced by ethanol (75%, 0.1 mL/10 g by oral route). The animals were euthanized 1 h after the administration of ethanol and their stomachs were removed. The uninjured control group consisted of untreated animals, exposed to experimental procedures, but with no ulcer induction (Caldas et al., 2015).

The excised stomach tissue was weighed and homogenized in a cold EDTA solution (0.02 mol/L). Aliquots of 320 µL of distilled water and 80 µL of trichloroacetic acid 50% aqueous solution were added to 400 µL of the homogenate for protein precipitation and the samples were then centrifuged at 604 × g for 15 min at 4°C. To a total of 400 µL of supernatant was added 800 µL of Tris 0.4 M (pH 8.9) and 20 µL of 5,5-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) 0.01 M. The mixture was then stirred and the absorbance was measured at 412 nm. The concentrations of non-protein sulfhydryl groups were expressed in µg of –SH groups/g of tissue (Sedlak and Lindsay, 1968).

2.8 Healing evaluation in the acetic acid-induced chronic ulcer model in rats

Chronic ulcer induction was based in the method described by Takagi et al. (1969), with some modifications. Animals were divided in three groups (n = 6), fasted for 24 h and then anesthetized for surgical exposure of the stomach. A volume of 0.05 mL of 30% acetic acid was injected into the subserosal layer of the stomach's external wall. The treatment started one day following the surgery and consisted of once a day oral administration of control (0.9% NaCl solution), pantoprazole (40

mg/kg) or EHG (100 mg/kg) for 14 consecutive days. During treatment, body weight, water and food consumption were registered daily. On day 15, the animals had blood collected for biochemical and hematological analyses. The animals were euthanized and the stomachs were removed, photographed and the gastric lesions surface area was determined by computerized planimetry (ImageJ[®] Launcher Software) and data expressed in mm².

2.9 Histologic analysis

For the stain with Hematoxylin and Eosin, the stomach tissue of the different groups were fixed in 10% buffered formalin and sectioned by microtome (Leica, Germany). Sections of 5 mm thickness were then stained with hematoxylin and eosin (HE). For mucosal glycoproteins staining, sections of the glandular layer within the gastric tissue were stained with PAS to differentiate the acidic and basic glycoproteins level in the mucus (Day et al., 2008).

2.10 Immunohistochemical analysis

Immunohistochemical staining was done according to standard protocol with few modifications (Dakocytomation, USA). In Brief, the slides were heated for 25 min at 60C in a hot-air oven (Venticell, MMM, Einrichtungen, Germany), deparaffinized in xylene and graded alcohol. Antigen retrieval was performed in 10 mM boiled sodium citrate buffer. Incubation with biotinylated primary antibodies namely COX-2 (1:200) and Ki-67 (1:75) was done for 15 min followed. Finally, counterstaining with DAB-substrate-chromagen or Ethylcarbazole (AEC) (Dako, K3461) was done prior to washing and hematoxylin addition. The staining intensities of COX-2 and Ki-67 were scored from + to +++ according to the following scale: (+) = faint immunoreactivity, (++) = moderate positive staining, and (+++) = strong positive staining. Cell positivity's (percentage of positive epithelial cells in the whole epithelium) were defined as follows: (+) = 1–25 % positive cells, (++) = 26–75 % positive cells, and (+++) ≥ 75 % positive cells. The final score was based on the results of both the analysis of intensity and cell positivity (Rantanen et al., 2014)

2.11 Statistical analysis

Results were expressed as mean \pm standard error from the mean. Data analysis was conducted with variance analysis (one-way ANOVA), followed by Dunnett's test or Tukey's test with the software GraphPadPrism, version 7.00. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

3. Results

3.1 Effect of EHG on gastric mucus production

The treatment intraduodenal with EHG 100 mg/kg resulted in an increase in mucus production in animals in comparison with control and carbenoxolone groups, as shown the Table 1.

3.2 Participation of nitric oxide in gastroprotective effect of EHG

Assessment of nitric oxide participation on EHG-mediated gastroprotection showed significant reduction of the lesion area on animals treated with carbenoxolone (100 mg/kg) or EHG (100 mg/kg) in 85.0 and 80.5%, respectively, compared to saline (negative control). A significant response was also shown in the groups pre-treated with L-NAME of 68.6% and 87.4%, compared to the saline administered group, as shown in Table 3.

3.3 Involvement of non-protein sulfhydryl groups in gastroprotective effect of EHG

The model evaluating involvement of sulfhydryl groups on the gastroprotective action of EHG from *Melipona fasciculata* Smith showed that animals previously administered saline (i.p), and treatment with carbenoxolone (100 mg/kg) or EHG (100 mg/kg) presented significant reduction of the lesion area of 54.3% and 56.4%, respectively. However, in groups pre-treated with N-ethylmaleimide (NEM) and treated with EHG, there was no mucosal protective action compared to the negative control, showing that the gastroprotective effect of EHG was inhibited on NEM presence, potentializing the ulcerogenic agent effect, as shown theTable 2.

3.4 Effects of EHG on the leves of non-protein sulfhydryl groups

The level of sulfhydryl groups (–SH groups) found in the gastric mucosa of the non-injured control group (CN) was $13.9 \pm 0.9 \mu\text{g/g}$ and pantoprazole (P) was $2.5 \pm 0.6 \mu\text{g/g}$ of tissue, but in animals of ethanol-injured control group (CL) was observed a reduction in levels of –SH groups ($4.9 \pm 1.0 \mu\text{g/g}$ of tissue) compared to the non-injured control group. Oral treatment with EHG (100 mg/kg) was able to revert the reduction of the in levels of sulfhydryl groups in the gastric mucosa, restoring the antioxidant system ($18.0 \pm 0.6 \mu\text{g/g}$). These results are presented in Figure 1.

3.5 Evaluation of healing in acetic acid-induced chronic ulcer model in rats

The model of induction of gastric ulcer by acetic acid showed an ulcerated area of $30.0 \pm 7.9 \text{ mm}^2$ in the control group. Treatment with pantoprazole (40 mg/kg) or EHG (100 mg/kg) reduced the area of the lesion in 79.8 and 59.0%, respectively, after 14 days. These results are presented in Figure 2.

3.6 Histological analysis

In the control group observed predominant inflammatory pattern, with areas of necrosis, hemorrhage and suppuration. Stomachs of animals treated with EHG, gastric tissue has been organized, with consolidated fibrosis and decreased

inflammation. In the rats that received treatment with pantoprazole is noted in the gastric mucosa decreased inflammatory intensity with tissue organization represented by neovascularization and fibrosis, epithelial ulceration and lightweight observed. Marking PAS (mucopolysaccharide materials) has become more intense in the stomachs of animals treated with EHG with diffuse epithelial marking (Figure 3).

3.7 Immunohistochemical analysis

Immunohistochemical research used monoclonal antibodies COX - 2 and Ki - 67. COX - 2 showed strong reactivity (+++), marked with a dark reddish brown color. Since Ki -67 showed a low reactivity (+) in the gastric mucosa of animals treated for 14 days EHG compared with the control group, which showed reactivity was moderate COX - 2 (++) , and down Ki -67 (+) (Figure 4).

4. Discussion

The current treatment for gastric ulcers include medications that can have significant adverse effects. (Silverstein et al., 2000). At the same time, the treatment of gastric ulcer symptoms with natural products has become a common practice (Ke et al., 2012). Thus, the investigation of new drugs is relevant and natural products play a key role since several extracts and their derivatives have shown promising results in the prevention and treatment of gastric ulcers (Lemos et al., 2011).

Different experimental models have been used to investigate several agents used in the treatment of peptic ulcers, contributing for the search for more efficient and safe therapeutic agents. This study aimed at investigating the gastroprotective and healing activities of the lyophilized hydroalcoholic extract of the geopropolis from *Melipona fasciculata* Smith (EHG). EHG showed significant reduction in gastric ulcers induced by ethanol and indomethacin, which led to evaluate the mechanisms involved in this activity.

Mucus is an important protective factor of the gastric mucosa, working as a barrier against gastrointestinal damage, and its production is stimulated by prostaglandins (Laine et al., 2008). Ulcerogenic substances cause the mucus gel and phospholipid layer to dissipate, resulting in lesion of the mucosa (Vendramini-Costa et al., 2014). EHG increased mucus production compared to the standard drug (carbenoxolone).

The role of nitric oxide (NO) on gastric mucosa integrity modulation and on the regulation of mucus and gastric secretion along with prostaglandins is well established (Tanaka et al., 2001; Andreo et al., 2006). NO is synthesized from L-arginine by the nitric oxide synthase (NOS), and both the constitutive (cNOS) and induced (iNOS) forms have been found on the normal gastric mucosa. In the normal gastric mucosa, NO inhibits gastric secretion, stimulates mucus and bicarbonate secretion, increases blood flow and enhances the process of healing of ulcers (Brown et al., 1994, Kochar et al., 2011), with the aim of investigating the relation of endogenous NO on the EHG-induced gastroprotection, L-NAME, a NOS inhibitor, was used. Pre-treatment with L-NAME resulted in no changes in the antiulcerogenic effect of EHG. These results suggest the gastric protective effect of the EHG is independent of NO production.

Non-protein sulfhydryl compounds (–SH groups) are essential elements for cytoprotection of the gastric mucosa. –SH groups enhance the gastroprotective effect maintaining the mucosal layer integrity. Besides, NP –SH present antioxidant properties against free radicals produced by damaging agents such as ethanol (Szabo et al., 1990). The greatest damage to the gastric mucosa induced by this agent is usually associated to decreased levels of NP –SH compounds (Boligon et al., 2014). In animals treated with NEM, a non-protein sulfhydryl compound inhibitor, the EHG gastroprotective effect decreased, suggesting that its effect is dependent on the presence of these groups (Sidahmed et al., 2016).

Geopropolis extract has several compounds, particularly phenolic ones (Dutra et al., 2014). Some secondary metabolites, such as flavonoids and tannins have been reported as presenting antiulcerogenic properties (Sravani et al., 2011). Tannins act as astringent and vasoconstrictor agents and have protein precipitating effect, making the outermost layer of the gastric mucosa less permeable and more resistant to lesions (Nwafor et al., 2000; Okokon et al., 2011). Flavonoids are polyphenolic compounds with known antioxidant property, that also strengthens the

mucosal defense system through stimulation of gastric mucus secretion (Mota et al., 2009; Choudhary et al., 2014). The gastroprotective activity of geopropolis from *Melipona fasciculata* Smith may be due to the presence of flavonoids and other antioxidants.

The release of oxygen-derived free radicals is a pathogenic factor of gastric mucosal injury associated with stress, anti-inflammatory drugs and ethanol-induced ulcer (Nayto et al., 2011). It is known that ethanol is able to deplete levels of non-protein sulfhydryls (SHs) compounds, such as reduced glutathione (GSH) in gastric tissue (Bhattacharyya et al., 2014). GSH is a tripeptide endogenous compound present in gastric tissue and provides gastroprotection by scavenging oxygen free radicals, depletion of gastric mucosal GSH may result in gastric damage by accumulation of free radicals (Demir et al., 2003).

In an attempt to determine the participation of protective factors in gastric mucosa against ethanol, quantify the concentration of sulfhydryl groups non-protein (GSH), an important factor in protecting the gastric mucosa (Moura Rocha et al., 2010). In addition to its action as a chemical antioxidant, GSH also It acts on the first line of antioxidant defense, as a cofactor of glutathione peroxidase, reducing reactive oxygen species and there is a concomitant formation of oxidized disulfide , GSSG (El Eter et al., 2006).

In assessing the effect of EHG on activity of antioxidant enzymes GSH after lesion induction by ethanol, it was found that it increased the GSH activity so significant, validating other results , suggesting a gastric protective effect via antioxidant activity.

This study also assessed the EHG action on the chronic ulcer experimental model. This test is justified by the responses obtained in ethanol and indometacin - induced acute ulcer models (data not yet published). Gastric ulcer is the result of a complex interaction among a large number of biomarkers on the gastric mucosa. Changes in the concentrations of these biomarkers may lead to an unbalance between protection and aggression of the mucosa, resulting in worsening of the ulcers (Amagase and Okabe, 2003). Oral administration of EHG significantly reduced the ulcer area, as well as the standard drug, pantoprazole. The healing activity of EHG was evidenced in histopathology, and most COX -2 expression in EHG group. Increased COX-2 expression have all been shown to be associated with gastric defense (Junqueira-Junior et al., 2011).

The involvement of oxygen reactive species in several diseases and the potential antioxidant effect of natural compounds on biological tissues have been extensively discussed. Several studies show that uncontrolled activity of free radicals is directly connected to different pathologies (Saraswathi et al., 2014, Shivakumar et al., 2014; Mohod et al., 2016), suggesting that phenolic compounds of the geopropolis from *Melipona fasciculata* Smith may contribute to the healing activity shown here.

5. Conclusion

The results obtained here show that the lyophilized hydroalcoholic extract geopropolis of *Melipona fasciculata* Smith (EHG) presents the involvement of non-protein sulfhydryl groups related gastroprotective activity, in addition to the increase in gastric mucus production. Furthermore , EHG has a healing action on the gastric mucosa .

Conflicts of interest

Authors declare that there are no conflicts of interest regarding the publication of this study.

Acknowledgements

Authors would like to thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-Brasil), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Brasil) and Fundação de Amparo à Pesquisa do estado do Maranhão (FAPEMA) for financial support.

References

- Amagase K., Okabe S. 2003. On the mechanisms underlying histamine induction of gastric mucosal lesions in rats with partial gastric vascular occlusion. *J. Pharm. Sci.* 92: 124–136.
- Andreo MA, Ballesteros KV, Hiruma-Lima CA, Machado da Rocha LR, Souza Brito AR, Vilegas W. 2006. Effect of Mouriri pusa extracts on experimentally induced gastric lesions in rodents: role of endogenous sulfhydryls compounds and nitric oxide in gastroprotection. *J Ethnopharmacol.* 107(3) : 431-441
- Arrieta J, Benitez J, Flores E, Castilho C, Navarrete A. 2003. Purification of gastroprotective triterpenoids from the stem bark of *Amphipterugium adstringens*, role of prostaglandins, sulfhydryls, nitric oxide and capsaicin-sensitive neurons. *Planta Med* 69: 905–909.
- Bankova V, Christov R, Marcucci MC, Popov S. 1998. Constituents of brazilian geopropolis. *Z Naturforschung* 53c: 402-406.
- Bhattacharyya A, Chattopadhyay R, Mitra S, Crowe SE. 2014. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. *Physiol Rev.* 94(2):329-54. doi: 10.1152/physrev.00040.2012.
- Brown JF, Tepperman BL, Hanson PJ, Whittle BJ. 1994. Lipopolysaccharide induces Ca(2+)-independent nitric oxide synthase activity in rat gastric mucosal cells. *Eur J Pharmacol.* 292(1):111-4.
- Boligon AA, de Freitas RB, de Brum TF, Waczuk EP, Klimaczewski CV, de Ávila DS, Athayde ML, de Freitas Bauermann L. 2014. Antiulcerogenic activity of *Scutia buxifolia* on gastric ulcers induced by ethanol in rats. *Acta Pharm Sin B.* 4(5):358-67. doi: 10.1016/j.apsb.2014.05.001.
- Caldas, Caldas GFR, Oliveira AR, Araújo AV, Lafayette SS, Albuquerque GS, Silva-Neto J da C, Costa-Silva JH, Ferreira F, Costa JG, Wanderley AG. 2015. Gastroprotective Mechanisms of the Monoterpene 1,8-Cineole (Eucalyptol). *PLoS One.* 10(8):e0134558. doi: 10.1371/journal.pone.0134558.

Choudhary M, Kumar V, Singh S. 2014. Gastric antisecretory and cytoprotective effects of hydroalcoholic extracts of *Plumeria alba* Linn. leaves in rats. *J Integr Med.* 12(1):42-51. doi: 10.1016/S2095-4964(14)60002-9.

Cinegaglia NC, Bersano PR, Araújo MJ, Búfalo MC, Sforcin JM. 2013. Anticancer effects of geopropolis produced by stingless bees on canine osteosarcoma cells in vitro. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013:737386. doi: 10.1155/2013/737386.

Coelho GR, Mendonça RZ, Vilar K de S, Figueiredo CA, Badari JC, Taniwaki N, Namiyama G, De Oliveira MI, Curti SP, Evelyn Silva P, Negri G. 2015. Antiviral Action of Hydromethanolic Extract of Geopropolis from *Scaptotrigona postica* against Antih herpes Simplex Virus (HSV-1). *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015:296086. doi: 10.1155/2015/296086.

Corne SJ, Morrissey SM, Woods RJ. 1974. Proceedings: A method for the quantitative estimation of gastric barrier mucus. *J Physiol.* 242(2):116P-117P.

Da Cunha MG, Franchin M, de Carvalho Galvão LC, de Ruiz AL, de Carvalho JE, Ikegaki M, de Alencar SM, Koo H, Rosalen PL. 2013. Antimicrobial and antiproliferative activities of stingless bee *Melipona scutellaris* geopropolis. *BMC Complement Altern Med.* 13:23. doi: 10.1186/1472-6882-13-23.

Da Cunha MG, Franchin M, Galvão LC, Bueno-Silva B, Ikegaki M, de Alencar SM, Rosalen PL. 2013. Apolar Bioactive Fraction of *Melipona scutellaris* Geopropolis on *Streptococcus mutans* Biofilm. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013:256287. doi: 10.1155/2013/256287.

Da Cunha MG, Rosalen PL, Franchin M, de Alencar SM, Ikegaki M, Ransom T, Beutler JA. 2016. Antiproliferative Constituents of Geopropolis from the Bee *Melipona scutellaris*. *Planta Med.* 82(3):190-4. doi: 10.1055/s-0035-1558142.

Day MJ, Bilzer T, Mansell J, Wilcock B, Hall EJ, Jergens A, Minami T, Willard M, Washabau R; World Small Animal Veterinary Association Gastrointestinal Standardization Group. 2008. Histopathological standards for the diagnosis of gastrointestinal inflammation in endoscopic biopsy samples from the dog and cat: a

report from the World Small Animal Veterinary Association Gastrointestinal Standardization Group. J Comp Pathol. 138 Suppl 1:S1-43. doi: 10.1016/j.jcpa.2008.01.001.

Demir S, Yilmaz S, Köseoğlu M, Akalin N, Aslan D, Aydın A. 2003. Role of free radicals in peptic ulcer and gastritis. Turk J Gastroenterol. 14 (1): 39-43.

Duailibe SA, Gonçalves AG, Ahid FJ. 2007. Effect of a propolis extract on *Streptococcus mutans* counts in vivo. J Appl Oral Sci. 15(5):420-3.

Dutra RP, Abreu BV, Cunha MS, Batista MC, Torres LM, Nascimento FR, Ribeiro MN, Guerra RN. 2014. Phenolic acids, hydrolyzable tannins, and antioxidant activity of geopropolis from the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. J Agric Food Chem. 62(12):2549-57. doi: 10.1021/jf404875v.

Dutra RP, Nogueira AMC, Marques RRO, Costa MCP, Ribeiro MNSR. 2008. Avaliação farmacognóstica de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith da Baixada maranhense, Brasil. Braz J. Pharmacogn. 18(4).

El Eter E, Al Tuwajjiri A, Hagar H, Arafa M. 2006. *In vivo* and *in vitro* antioxidant activity of ghrelin: Attenuation of gastric ischemic injury in the rat. Journal of Gastroenterology and Hepatology. 1: 1-9.

Ford AC, Gurusamy KS, Delaney B, Forman D, Moayyedi P. 2016. Eradication therapy for peptic ulcer disease in *Helicobacter pylori*-positive people. Cochrane Database Syst Ver. 4:CD003840. doi: 10.1002/14651858.CD003840.pub5.

Franchin M, da Cunha MG, Denny C, Napimoga MH, Cunha TM, Koo H, de Alencar SM, Ikegaki M, Rosalen PL. 2012. Geopropolis from *Melipona scutellaris* decreases the mechanical inflammatory hypernociception by inhibiting the production of IL-1 β and TNF- α . J Ethnopharmacol. 143(2):709-15. doi: 10.1016/j.jep.2012.07.040.

Franchin M, da Cunha MG, Denny C, Napimoga MH, Cunha TM, Bueno-Silva B, Matias de Alencar S, Ikegaki M, Luiz Rosalen P. 2013. Bioactive Fraction of Geopropolis from *Melipona scutellaris* Decreases Neutrophils Migration in the

Inflammatory Process: Involvement of Nitric Oxide Pathway. Evid Based Complement Alternat Med. 2013;907041. doi: 10.1155/2013/907041.

Gurusamy KS, Pallari E. 2016. Medical versus surgical treatment for refractory or recurrent peptic ulcer. Cochrane Database Syst Rev. 3:CD011523. doi: 10.1002/14651858.CD011523.pub2.

Junqueira-Júnior J, Junqueira AF, Medeiros JV, Barbosa SH, Nogueira AC, Mota JM, Santana AP, Brito GA, Ribeiro RA, Lima-Júnior RC, Souza MH. 2011. Role of capsaicin-sensitive primary afferent neurons and non-protein sulphhydryl groups on gastroprotective effect of amifostine against ethanol-induced gastric damage in rats. Dig Dis Sci. 56(2):314-22. doi: 10.1007/s10620-010-1300-8.

Ke F, Yadav PK, Ju LZ. 2012. Herbal Medicine in the Treatment of Ulcerative Colitis. Saudi Journal of Gastroenterology: Official Journal of the Saudi Gastroenterology Association. 18(1):3-10. doi:10.4103/1319-3767.91726. Kochar NI, Chandewal AV, Bakal RL, Kochar PN. 2011. Nitric oxide and the gastrointestinal tract. Int J Pharm. 7(1): 31-39.

Lemos M, Santin JR, Júnior LC, Niero R, Andrade SF. 2011. Gastroprotective activity of hydroalcoholic extract obtained from the leaves of *Brassica oleracea* var. *acephala* DC in different animal models. J Ethnopharmacol. 138(2):503-7. doi: 10.1016/j.jep.2011.09.046.

Liberio SA, Pereira AL, Dutra RP, Reis AS, Araújo MJ, Mattar NS, Silva LA, Ribeiro MN, Nascimento FR, Guerra RN, Monteiro-Neto V. 2011. Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. BMC Complement Altern Med. 11:108. doi: 10.1186/1472-6882-11-108.

Lima, CM, Lima AK, Melo, MGD, Dória, GAA, Leite, BLS, Serafini, MR, Albuquerque-Júnior, RLC, Araújo, AAS. 2014. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. Sci. Plena, 10: 034601.

Matsuda H, Li Y, Yoshikawa M. 1999. Roles of capsaicin-sensitive sensory nerves, endogenous nitric oxide, sulphhydryls and prostaglandins in gastroprotection by mormodin, an oleanolic acid oligoglycoside, on ethanol-induced gastric mucosal lesion in rats. *Life Sciences* 65: 27–32. doi: 10.1016/S0024-3205(99)00241-6

Mohod SM, Kandhare AD, Bodhankar SL. 2016. Gastroprotective potential of Pentahydroxy flavone isolated from *Madhuca indica* J. F. Gmel. leaves against acetic acid-induced ulcer in rats: The role of oxido-inflammatory and prostaglandins markers. *J Ethnopharmacol.* 182:150-9. doi: 10.1016/j.jep.2016.02.026.

Mota KS, Dias GE, Pinto ME, Luiz-Ferreira A, Souza-Brito AR, Hiruma-Lima CA, Barbosa-Filho JM, Batista LM. 2009. Flavonoids with gastroprotective activity. *Molecules.* 14(3):979-1012. doi: 10.3390/molecules14030979.

Moura Rocha NF, Venâncio ET, Moura BA, Gomes Silva MI, Aquino Neto MR, Vasconcelos Rios ER, De Sousa DP, Mendes Vasconcelos SM, De França Fonteles MM, De Sousa FC. 2010. Gastroprotection of (-)-alpha-bisabolol on acute gastric mucosal lesions in mice: the possible involved pharmacological mechanisms. *Fundam Clin Pharmacol.* 24(1):63-71. doi: 10.1111/j.1472-8206.2009.00726.x.

Naito Y, Suematsu M, Yoshikawa T (eds). 2011. *Free Radical Biology in Digestive Diseases.* Front Gastrointest Res. Basel. 29: 97–110. DOI:10.1159/000319978

Nwafor PA, Okwuasaba FK, Binda LG. 2000. Antidiarrhoeal and antiulcerogenic effects of methanolic extract of *Asparagus pubescens* root in rats. *J Ethnopharmacol.* 72(3): 421-427.

Okabe S, Amagase K. 2005. An overview of acetic acid ulcer models: the history and state of the art of peptic ulcer research. *Biol Pharm Bull* 28: 1321–1341. doi: 10.1248/bpb.28.1321

Okokon JE, Akpan HD, Umoh EE, Ekaidem IS. 2011. Antidiarrhoeal and antiulcer activities of *Hippocratea africana* root extract. *Pak J Pharm Sci.* 24(2):201-5.

Patel HR, Dhande P. 2016. Imprudent Gastro-protective Approach in Majority of Specialists' Clinics of a Tertiary Hospital. *J Clin Diagn Res.* 10(3):FC12-5. doi: 10.7860/JCDR/2016/16976.7499.

Rantanen T, Udd M, Honkanen T, Miettinen P, Kärjä V, Rantanen L, Julkunen R, Mustonen H, Paavonen T, Oksala N. 2014. Effect of omeprazole dose, nonsteroidal anti-inflammatory agents, and smoking on repair mechanisms in acute peptic ulcer bleeding. *Dig Dis Sci.* (11):2666-74. doi: 10.1007/s10620-014-3242-z.

Ribeiro-Junior JA, Franchin M, Cavallini ME, Denny C, De Alencar SM, Ikegaki M. 2015. Gastroprotective Effect of Geopropolis from *Melipona scutellaris* Is Dependent on Production of Nitric Oxide and Prostaglandin. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* 459846: 5 p. doi: 10.1155/2015/459846.

Robinson P., Perkins JC Jr. 2016. Approach to Patients with Epigastric Pain. *Emerg Med Clin North Am.* 34(2):191-210. doi: 10.1016/j.emc.2015.12.012.

Saraswathi KY, Muthal AP, Kandhare A, Rojatkar S, Bodhankar SL. 2014. Study of methanolic extract of *Artemisia pallens* wall on endurance of laboratory animals. *Pharmacologia,* 5:298–309.

Sforcin JM, Bankova V. 2011. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? *J Ethnopharmacol.* 133(2):253-60. doi: 10.1016/j.jep.2010.10.032.

Shivakumar V, Kandhare AD, Rajmane AR, Adil M, Ghosh P, Badgujar LB, Saraf MN, Bodhankar SL. 2014. Estimation of the long-term cardiovascular events using ukpds risk engine in metabolic syndrome patients. *Indian J. Pharm. Sci.,* 76: 174.

Sidahmed HM, Hashim NM, Mohan S, Abdelwahab SI, Taha MM, Dehghan F, Yahayu M, Ee GC, Loke MF, Vadivelu J. 2016. Evidence of the gastroprotective and anti- *Helicobacter pylori* activities of β -mangostin isolated from *Cratoxylum arborescens* (vahl) blume. *Drug Des Devel Ther.* 10:297-313. doi: 10.2147/DDDT.S80625.

Silverstein FE, Faich G, Goldstein JL, Simon LS, Pincus T, Whelton A, Makuch R, Eisen G, Agrawal NM, Stenson WF, Burr AM, Zhao WW, Kent JD, Lefkowitz JB,

Verburg KM, Geis GS. 2000. Gastrointestinal toxicity with celecoxib vs nonsteroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: the CLASS study: A randomized controlled trial. Celecoxib Long-term Arthritis Safety Study. *JAMA*. 284 (10):1247-55. doi:10.1001/jama.284.10.1247.

Sravani P, Jayasri P, Samiulla, Ershad Khan P, Nishad Khan P. 2011. Review on natural antiulcer agents. *Int J Pharm Ind Res*. 1(1): 67-70.

Szabo S, Vattay P. 1990. Experimental gastric and duodenal ulcers. Advances in pathogenesis. *Gastroenterol Clin North Am*. 19(1):67–85.

Sedlak J, Lindsay RH. 1968. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem*. 25(1):192-205.

Takagi K, Okabe S, Saziki R. 1969. A new method for the production of chronic gastric ulcer in rats and effects of several drugs on its healing. *Jpn. J. Pharmacol* 19: 418–426.

Tanaka J, Yuda Y, Inouye S, Yamakawa T. 2001. The role of nitric oxide in the gastric acid secretion induced by ischemia-reperfusion in the pylorus-ligated rat. *Eur J Pharmacol*. 424(1) : 69-74.

Vendramini-Costa DB, Monteiro KM, Iwamoto LH, Jorge MP, Tinti SV, Pilli RA. 2014. Gastroprotective effects of goniotalamin against thanol and indomethacin-induced gastric lesions in rats: Role of prostaglandins, nitric oxide and sulfhydryl compounds. *Chemico-Biological Interactions*, 224: 206–212. doi: 10.1016/j.cbi.2014.10.025.

Vijayakumar AR, Daniel EP, Ilavarasan R, Venkataraman S, Vijayakumar S. 2016. Ulcer Protective Activity of *Jatropha gossypifolia* Linn. in Wistar Rats. *Pharmacognosy Res*. 8(Suppl 1): S61-6. doi: 10.4103/0974-8490.178640.

Table 1. Effect of the hydroalcoholic extract of geopropolis (EHG) from *Melipona fasciculata* Smith on the gastric mucus

Treatment	Dose (mg/kg)	µg of Alcian blue / g glandular tissue
Control	----	157.0 ± 8.2
carbenoxolone	200	198.4 ± 15.9
EHG	100	236.7 ± 10.4* #

Results are expressed as mean ± standard error of the mean (n = 6). *Statistically different from control group, #Statistically different from carbenoxolone group (ANOVA followed by Tukey's test, *p < 0.05).

Table 2. Involvement of sulfhydryl groups (–SH groups) on the gastroprotective effect of EHG from *Melipona fasciculata* Smith in ethanol-induced gastric ulcer.

Pre-treatment (i.p.)	Treatment (p.o.)	Dosage (mg/kg)	Ulcerated area (mm ²)	Inhibition (%)
0.9% NaCl solution	Control	-	16.6 ± 2.3	-
	carbenoxolone	100	7.6 ± 1.7*	54.3
	EHG	100	7.2 ± 1.2*	56.4
NEM	Control	-	65.9 ± 9.0#	-
	carbenoxolone	100	29.7 ± 5.2*	54.8
	EHG	100	43.1 ± 9.1	34.5

Values expressed as mean ± standard error of the mean (n = 6). *Statistically different from control group, #Significant values between groups, ANOVA followed by Tukey's test (control group NaCl vs. control group NEM).

Table 3. Involvement of nitric oxide (NO) on the gastroprotective effect of EHG from *Melipona fasciculata* Smith in ethanol-induced chronic ulcer.

Pre-treatment (i.p.)	Treatment (p.o.)	Dosage (mg/Kg)	Ulcerated area (mm²)	Inhibition (%)
	Control	-	17.3 ± 3.6	-
0.9%NaCl solution	carbenoxolone	100	2.6 ± 0.9*	85.04
	EHG	100	3.4 ± 0.8*	80.55
	Control	-	38.6 ± 5.2 [#]	-
L-NAME	carbenoxolone	100	12.1±2.8*	68.60
	EHG	100	4.9±1.4*	87.41

Values expressed as mean ± standard error of the mean (n = 6). *Statistically different from control group, [#]Significant values between groups, ANOVA followed by Tukey's test (control group NaCl vs. control group L-NAME).

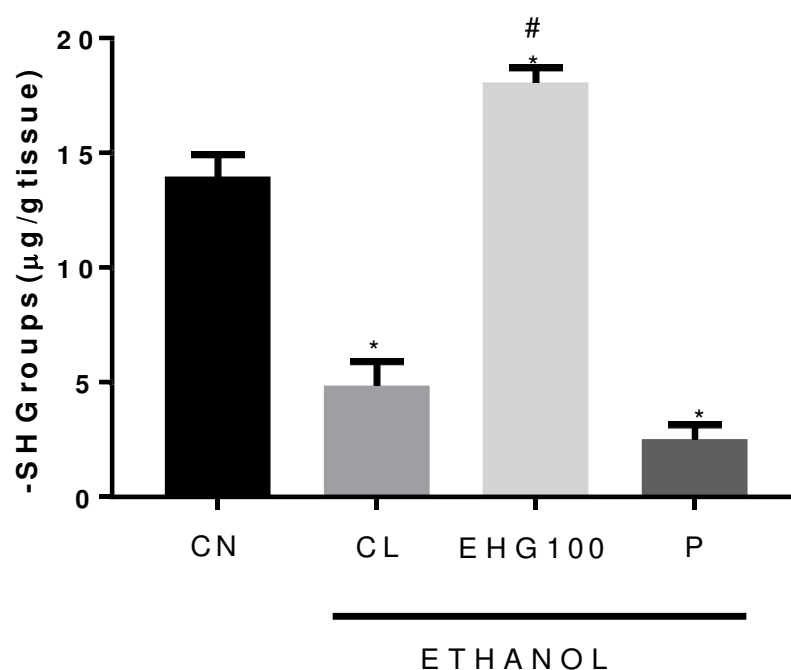


Figure 1: Effect of EHG on levels of sulfhydryl groups in the gastric ulcers model induced by ethanol. The non-injured control group (CN) received no treatment. The experimental groups received 0.9% NaCl solution (CL, injured control), pantoprazole (P, 40 mg/kg) or EHG (100 mg/kg). Results are expressed as mean \pm standard error of the mean (n = 5). ANOVA followed by Tukey's test (*p < 0.05 vs. non-injured control group-CN and #p < 0.05 vs. injured control group-CL).

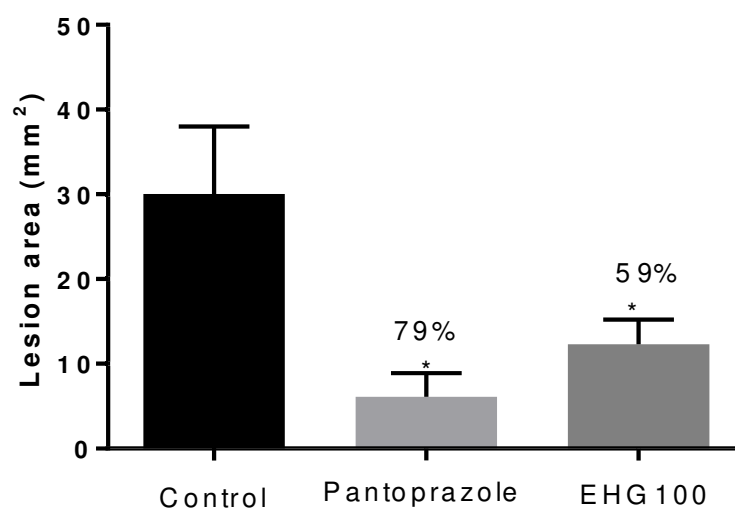


Figure 2: EHG effect on 30% acetic acid-induced gastric ulcer in rats. Results are expressed as mean \pm standard error of the mean (n = 6). *Statistically different from control group, ANOVA followed by Tukey's test (*p < 0.05 vs. control group).

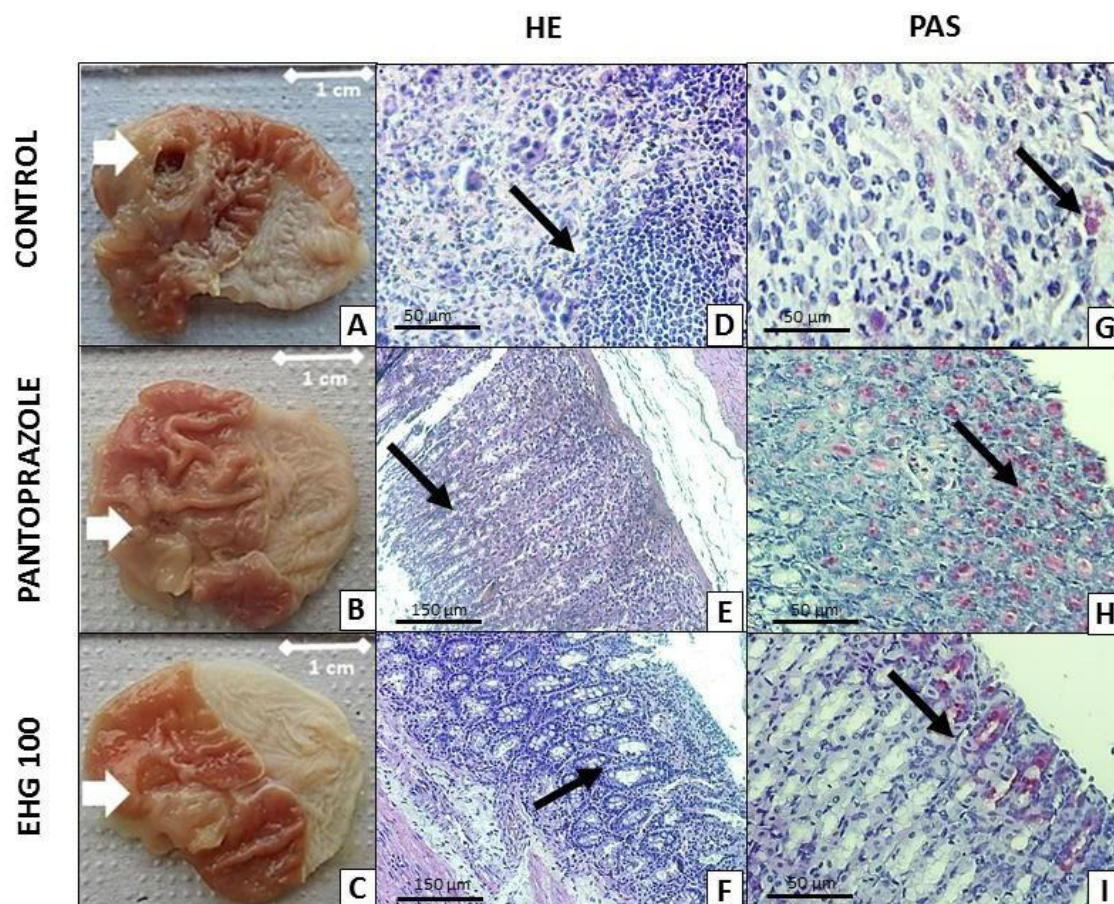


Figure 3. Macroscopical appearance of the gastric ulcer and photomicrographs of gastric mucosa stained with HE and PAS of the rats subjected to induction of chronic ulcer by 30% acetic acid. Animals were treated orally with 0,9% NaCl aqueous solution (control group), pantoprazole (40 mg/kg) or EHG (100 mg/kg) for 14 days. Macroscopical appearance of the gastric ulcer (A, B, and C), the white arrows indicate areas damaged by acetic acid. Haematoxylin/eosin (HE: D, E and F) and Periodic Acid–Schiff staining (PAS: G, H and I), magnification, 10x (HE) or 20x (PAS). Blacks arrows indicate regions inflammatory and marking of the secretory cells, respectively.

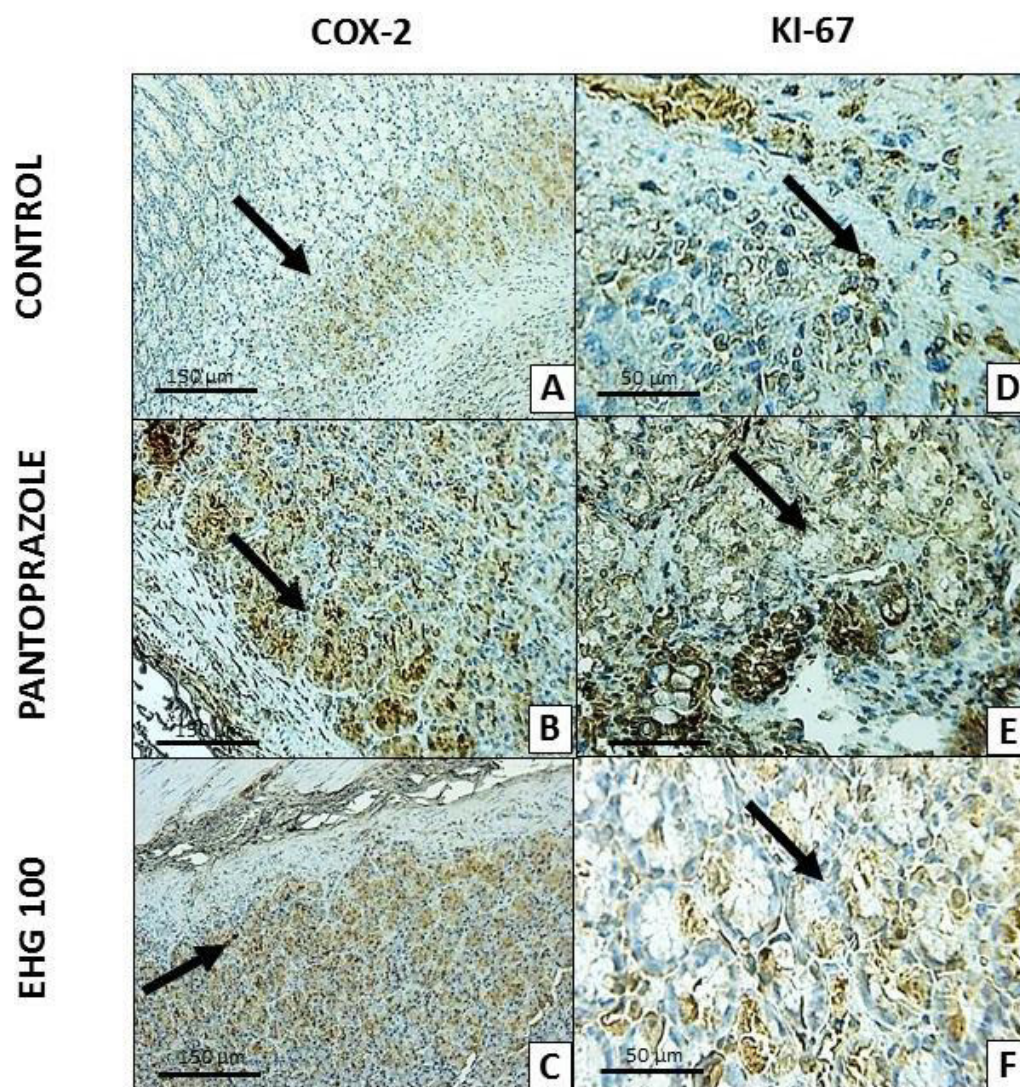


Figure 4. Immunohistochemical analysis for COX-2 and Ki-67 of the gastric mucosa of the rats subjected to induction of chronic ulcer by 30% acetic acid.

Animals were treated orally with 0,9% NaCl solution (control group), pantoprazole (40 mg/kg) or EHG (100 mg/kg) for 14 days. Microphotographs depict the immunoreactivity for COX-2 (A, B and C) and Ki-67 (D, E and F) in the groups, magnification 10x (COX-2) and 20x (Ki-67). Black arrows indicate regions positive for the evaluated markers.

Capítulo III

7. CAPÍTULO III

**Patente depositada:
“COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS PARA DISTÚRBIOS GÁSTRICOS A
BASE DE GEOPRÓPOLIS”**

7.1 Resumo

“COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS PARA DISTÚRBIOS GÁSTRICOS A BASE DE GEOPRÓPOLIS”

A presente invenção trata-se de composições farmacêuticas a base de extrato liofilizado de geoprópolis e seu uso no auxílio do tratamento de distúrbios gástricos, como alternativa de origem natural eficiente sem a complexidade das formulações e os significativos efeitos adversos apresentados pelos tratamentos convencionais de combate a gastrites e úlceras pépticas.

7.2 Reivindicações

“COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS PARA DISTÚRBIOS GÁSTRICOS A BASE DE GEOPRÓPOLIS”

1. “Composições farmacêuticas para distúrbios gástricos”, caracterizado por serem constituídas de extrato hidroalcoólico liofilizado (EHG) da geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith (Tiúba) nas concentrações de 5 a 500 mg nas seguintes composições: cápsulas, xarope, solução oral (gotas) e cápsulas de liberação prolongada.
2. “Composições farmacêuticas para distúrbios gástricos”, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por cápsulas contendo extrato hidroalcoólico liofilizado (EHG) da geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith (Tiúba) em concentrações de 100 a 200 mg.
3. “Composições farmacêuticas para distúrbios gástricos”, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por xarope contendo extrato hidroalcoólico liofilizado (EHG) da geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith (Tiúba) em concentrações de 50 a 150 mg.
4. “Composições farmacêuticas para distúrbios gástricos”, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por solução oral (gotas) contendo extrato hidroalcoólico liofilizado (EHG) da geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith (Tiúba) em concentrações de 10 a 50 mg.
5. “Composições farmacêuticas para distúrbios gástricos”, de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por cápsulas de liberação prolongada contendo extrato hidroalcoólico liofilizado (EHG) da geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith (Tiúba) em concentrações de 50 a 100 mg.

Considerações Finais

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foi realizado um estudo pré-clínico com o extrato hidroalcoólico liofilizado da geoprópolis, produzida pela abelha *Melipona fasciculata* Smith (EHG), visando investigar sua atividade gastroprotetora e contribuir para sua validação como fonte alternativa para obtenção de novos medicamentos.

A geoprópolis é produzida pelas abelhas a partir da mistura de resinas, coletadas das plantas, com cera e terra ou barro. A composição química da amostra, que foi avaliada neste trabalho, proveniente do município Fernando Falcão, revelou os ácidos fenólicos, triterpenos e taninos hidrolisáveis, como compostos majoritários (Dutra, 2014).

Os resultados descritos no capítulo I e II deste trabalho nos permitem concluir que o extrato hidroalcoólico da geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith (EHG) apresenta atividade gastroprotetora, evidenciada nos modelos agudos e crônico, de indução de lesão gástrica, por agentes ulcerogênicos como o álcool, indometacina (AINE) e ácido acético. Este efeito pode estar relacionado ao aumento na produção de muco e redução da acidez gástrica, que foi promovida pelo EHG. Além disso, a proteção da mucosa gástrica, evidenciada para o extrato, envolve a presença de compostos sulfidrílicos, uma vez o EHG estimulou a produção destes compostos e a sua inibição pelo NEM, inibiu parcialmente sua atividade.

Considerando a composição química da geoprópolis, provavelmente os compostos fenólicos, com atividade antioxidante, identificados pelas análises cromatográfica e espectrométrica desta amostra, devem contribuir com o mecanismo de gastroproteção demonstrada pelo EHG.

Desta forma, os resultados dão suporte ao uso etnofarmacológico da geoprópolis e mostram seu potencial uso como bioproduto gastroprotetor.

Referências

REFERÊNCIAS

- AGHEL, Sara; et al. Effect of Iranian Propolis on Salivary Total Antioxidant Capacity in Gamma-irradiated Rats. **Journal of dental research, dental clinics, dental prospects**, v. 8, n. 4, p.235-239, 2014.
- ALENCAR, S.M.; et al. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, v.113, n. 2, p.278-283, 2007.
- ALIMI, H. et al. Antioxidant and antiulcerogenic activities of *Opuntia ficus indica* f. inermis root extract in rats. **Phytomedicine**. v. 17, n. 4, p.1120-1126, 2010.
- ALSHIKHO, M.J., et al. Zollinger-Ellison Syndrome Associated with von Recklinghausen Disease: Case Report and Literature Review. **Am J Case Rep**. 13;17:398-405, 2016.
- AMAGASE, K. et al. Importance of cyclooxygenase-1/prostacyclin in modulating gastric mucosal integrity under stress conditions. **J Gastroenterol Hepatol**. Suppl 4:3-10, 2014.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Stomach Cancer**. Atlanta, GA: American Cancer Society. Disponível em: <<http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003141-pdf.pdf>>. Acesso em: 20 mai. 2014.
- ARAÚJO, Grace Kelly P.; et al. Physical, antimicrobial and antioxidant properties of starch-based film containing ethanolic propolis extract. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 50, n. 9, p.2080-2087, 2015.
- ARAUJO, Maria José A. M. et al. Efeito do tratamento com própolis de *Scaptotrigona aff. postica* sobre o desenvolvimento do tumor de Ehrlich em camundongos. **Rev. bras. farmacogn.**, Curitiba , v. 20, n. 4, p. 580-587, set. 2010 .
- ARRAIS, P.S.D.; et al. Perfil da automedicação no Brasil. **Rev.Saúde Pública**, v. 31, n.1, 1997.
- ASO, K., et al. Inhibitory effect of propolis on the growth of human leukemia U937. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. v. 27, p. 727–730, 2004.
- BACCARI, M. C. Orexins and Gastrointestinal Functions. **Current Protein and Peptide Science**, v. 11, n. 2, p. 148-155, Mar. 2010.
- BALEIRAS, Sebastião. Abordagem do paciente com problemas digestivos: prevenção da obstipação. Disponível em: <http://csgois.web.interacesso.pt/MGFV001MASTER/textos/44/205_texto.html>. Acesso em: 22. Jun. 2016.
- BARLAK, Y.; et al. Effect of Turkish propolis extracts on proteome of prostate cancer

cell line. **Proteome Science**, v. 9, n. 74, 2011.

BARROS, Muriel Primon de; et al. Evaluation of antiulcer activity of the main phenolic acids found in Brazilian Green Propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, n. 3, p.372-377, 2008.

BER NIETO, Y. Protocolo terapéutico de la úlcera péptica. **Medicine - Programa de Formación Médica Continuada acreditado**, v. 11, n. 3, p.179-182, 2012.

BESANKO, L.K. et al. Changes in esophageal and lower esophageal sphincter motility with healthy aging. **J Gastrointestin Liver Dis**. v. 23, n. 3, p.243-8, 2014.

BIGHETTI, Aparecida Érica; ANTÔNIO, Márcia Aparecida; CARVALHO, João Ernesto de. Regulação e modulação da secreção gástrica. **Rev. Ciênc. Méd.**, Campinas, v. 11, n. 1, p.55-60, jan./abr., 2002.

BONVEHÍ, Josep Serra; GUTIÉRREZ, Arrate Lacalle. Antioxidant activity and total phenolics of propolis from the basque country (Northeastern Spain). **JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.88, n. 9, p.1387-1395, set. 2011.

BOYCE M, Warrington S. Effect of repeated doses of netazepide, a gastrin receptor anagonist, omeprazole and placebo on 24-h gastric acidity and gastrin in healthy subjects. **Br J Pharmacol**, 2013.

BRAGA, M.P. et al. Inibidores da bomba de prótons: Revisão e análise farmacoeconômica. **Saúde (Santa Maria), Ahead of Print**, v.37, n.2, p. 19-32, 2011.

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

BUTLER, M.S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **J Nat Prod**. v. 67, p.2141-2153, 2004.

CABRAL, Marcelo A. **Anotações em Farmacologia e Farmácia Clínica**. Disponível em: <http://farmacolog.dominiotemporario.com/doc/cap_28_-_Farmacologia_do_TGI.pdf>. Acesso em: 13 abr. 2016.

CALVET, X. Nuevos datos sobre la eficacia de los inhibidores de la bomba de protones en la hemorragia digestiva alta. **Gastroenterol Hepatol**, v. 33, Supl. 1, p.11-14, 2010.

CARLI, D.M. et al. Peptic ulcer frequency differences related to H. pylori or AINEs. **Arq Gastroenterol**. 52(1):46-9, 2015.

CASTALDO, S; CAPASSO, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia** 73: 1-6, 2002.

CASTRO, S.L. Propolis: biological and pharmacological activities. Therapeutic uses of this bee-product. **Annual Review of Biomedical Science**, v. 3, p.49-83, 2001.

- CAVIERES, M.F. Developmental toxicity of misoprostol: an update. **Rev Med Chil.**, 139(4):516-23, 2011.
- CHALEEK, N.; et al. Effects of orexin and glucose microinjected into the hypothalamic paraventricular nucleus on gastric acid secretion in conscious rats. **Neurogastroenterol Motil**, v. 24, p.194-102, 2012.
- CHANCHAO, C.; et al. *Trigona laeviceps* propolis: Chemical compositions and antiproliferative activity on cancer cell lines. **Planta Medica**, v. 77, n. 12, p.1411-1412, ago. 2011.
- CHEN, C.N., et al. Cytotoxic prenylflavanones from Taiwanese propolis. **Journal of Natural Products**, v. 66, p.503–506, 2003.
- CINEGAGLIA, Naiara Costa; et al. Anticancer Effects of Geopropolis Produced by Stingless Bees on Canine Osteosarcoma Cells In Vitro. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 6, 2013.
- COELHO, G.; et al. Antiviral Action of Hydromethanolic Extract of Geopropolis from *Scaptotrigona postica* against Antih herpes Simplex Virus (HSV-1). **Evidence-Based Complementary And Alternative Medicine**, 2015.
- COELHO, Luiz Gonzaga et al. 3rd BRAZILIAN CONSENSUS ON *Helicobacter pylori*. **Arq.Gastroenterol.**, São Paulo , v. 50, n. 2, p. 81-96, 2013.
- COELHO, Luiz Gonzaga Vaz; COELHO, Maria Clara de Freitas. **Enfermidades pépticas e *Helicobacter pylori***. Disponível em: <http://www.moreirajr.com.br/revistas.asp?fase=r003&id_materia=3693>. Acesso em: 15 abr. 2016.
- CUSHNIE, T.P.; LAMB, A.J. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. **Int J Antimicrob Agents.**, v.38, n.2, p.99-107, 2011.
- DA CUNHA, Marcos Guilherme; et al. Antimicrobial and antiproliferative activities of stingless bee *Melipona scutellaris* geopropolis. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n. 23, 2013.
- DA CUNHA, Marcos Guilherme; et al. Apolar Bioactive Fraction of *Melipona scutellaris* Geopropolis on *Streptococcus mutans* Biofilm. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 7, 2013.
- DA SILVA, Ellen Cristina Costa; et al. Constituintes fenólicos e atividade antioxidante da geoprópolis de duas espécies de abelhas sem ferrão amazônicas. **Química Nova**, v. 36, n. 5, p.628-633, jan. 2013.
- DA SILVA, Geice Ribeiro et al. Aspectos bioecológicos e genético-comportamentais envolvidos na conservação da abelha Jandaíra, *Melipona subnitida* Ducke (Apidae, Meliponini), e o uso de ferramentas moleculares nos estudos de diversidade. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 81, n. 3, p. 299-308, 2014 .

DE BARROS, Muriel Primon; et al. Effect of Brazilian green propolis on experimental gastric ulcers in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, n. 3, p.567-571, 2007.

DE FREITAS, Erika Lourenço et al. PERFIL DE UTILIZAÇÃO DE ANTIÁCIDOS POR USUÁRIOS DA FARMÁCIA UNIVERSITÁRIA DA UFMG, BELO HORIZONTE (MG). **Infarma**, v.18, n.9/10, p.36-40, 2006.

DE MENDONÇA, I. C. G., et al. (2015). Brazilian red propolis: phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 357. 2015.

DE SOUZA, Silvana Alves de Souza; et al. Composition and Antioxidant Activity of Geopropolis Collected by *Melipona subnitida* (Jandaíra) Bees. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, 2013.

DI SANTO, Roberto. Natural products as antifungal agents against clinically relevant pathogens. **Nat. Prod. Rep.**, v. 27, p.1084–1098, 2010.

DUALIBE, S.A.C. **Efeito do extrato de própolis na contagem de Streptococcus mutans da cavidade oral**. São Luís, 73p. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, 2004.

DUARTE, S., et al. The influence of a novel propolis on mutans streptococci biofilms and caries development in rats. **Archives of Oral Biology**, v. 51, p.15–22, 2006.

DUPRE, D.; TOSTIVINT, H. Evolution of the gastrin-cholecystokinin gene family revealed by synteny analysis. **Gen Comp Endocrinol**, v. 195, p.164-173, 2014.

DUTRA, Richard Pereira; et al. Phenolic Acids, Hydrolyzable Tannins, and Antioxidant Activity of Geopropolis from the Stingless Bee *Melipona fasciculata* Smith. **J. Agric. Food Chem**, v. 62, p. 2549–2557, 2014.

_____. Avaliação farmacognóstica de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith da Baixada maranhense, Brasil. **Braz J. Pharmacogn**, v. 18, n. 4, Out./Dez. 2008.

EL-GHAZALY, M. A.; et al. Anti-ulcerogenic effect of aqueous propolis extract and the influence of radiation exposure. **International journal of radiation biology**, v. 87, n. 10, p.1045-51, 2011.

ELIASSI, A.; NAZARI, M.; NAGHDI, N. Role of the ventromedial hypothalamic orexin-1 receptors in regulation of gastric acid secretion in conscious rats. **J Neuro Endocrinol**, v. 21, p. 177–182, 2009.

FEDERAÇÃO BRASILEIRA DE GASTROENTEROLOGIA - FBG. **Úlceras Pépticas**. Disponível em: <<http://www.fbg.org.br/Textos/194/%C3%A9lceras-P%C3%A9pticas->>. Acesso em: 31 mar. 2016.

FOX, R.K.; MUNIRAJ, T. Pharmacologic Therapies in Gastrointestinal Diseases.

Med Clin North Am. 100(4):827-50, 2016.

_____. **Projeto Diretrizes: Úlcera Péptica.** Associação Médica Brasileira / Conselho Federal de Medicina, 2003.

FRANCHIN, Marcelo; et al. Geopropolis from *Melipona scutellaris* decreases themechanical inflammatory hypernociception by inhibiting the production of IL-1b and TNF-a. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, p. 709–715, 2012.

_____. Bioactive Fraction of Geopropolis from *Melipona scutellaris* Decreases Neutrophils Migration in the Inflammatory Process: Involvement of Nitric Oxide Pathway. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 9, 2013.

FREITAS, M.O.; et al. Flavonoids and Triterpenes from the nest of the stingless bee *Trigona spinipes*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, p.532-535, 2008.

GAHETE, M.D.; et al. Ghrelin gene products, receptors, and GOAT enzyme: biological and pathophysiological insight. **J Endocrinol**, v. 220, R1-R24, 2014.

GARG, T.; et al. Gastroretentive Drug Delivery Systems for Therapeutic Management of Peptic Ulcer. **Critical Reviews In Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 31, n. 6, p.531-557, 2014.

GARGALLO, C.; SERRANO, T.; GOMOLLÓN, F. Protocolo de seguimiento de la infección por *Helicobacter pylori*. **Medicine - Programa de Formación Médica Continuada acreditado**, v. 11, n. 2, p.131-134, 2012.

GYAWALI, C.P.; PATEL, A. Esophageal motor function: technical aspects of manometry. **Gastrointest Endosc Clin N Am.** 24(4):527-43, 2014. doi: 10.1016/j.giec.2014.06.003.

GOMES, V.A.; et al. Estudos das atividades antiinflamatórias e antinociceptiva da própolis de *Melipona compressipes fasciculata* Smith (tiúba). In: **XV Seminário de Iniciação Científica.** São Luís, 2003.

GREGORIS, Elena; et al. Propolis as potential cosmeceutical sunscreen agent for its combined photoprotective and antioxidant properties. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 405, n. 1, p.97-101, 2011.

GREGORIS, Elena; STEVANATO, Roberto. Correlations between polyphenolic composition and antioxidant activity of Venetian própolis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 1, p.76-82, 2010.

GRONEBERG, D.; et al. Dominant role of interstitial cells of Cajal in nitrgic relaxation of murine lower oesophageal sphincter. **J Physiol**, v. 593, n. 2, p.403-414, 2015.

GÜLÇİN, İlhami; et al. Polyphenol contents and antioxidant activity of lyophilized

aqueous extract of propolis from Erzurum, Turkey; Food and chemical toxicology. **International Journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 48, n. 8-9, p.2227-38, 2010.

GUO, XIALI; et al. Chemical Compositions and Antioxidant Activities of Water Extracts of Chinese Propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2011.

GYAWALI, C.P.; PATEL, A. Esophageal motor function: technical aspects of manometry. **Gastrointest Endosc Clin N Am**. v. 24, n. 4, p.527-43, 2014.

GYIRES, Klára; ZÁDORI, Zoltán S. Brain neuropeptides in gastric mucosal protection. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 19, p.24–30, 2014.

HAVSTEEN, B. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutic**, v. 96, n. 67, p.202, 2002.

HELGADOTTIR, H.; et al. The effects of long-term therapy with proton pump inhibitors on meal stimulated gastrin. **Dig Liver Dis**, v. 46, p.125-130, 2014.

HOLTMANN, G., TALLEY, N.J. The stomach-brain axis. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**. 28 (6):967-79, 2014.

HONGZHUAN, Xuan; et al. Antitumor Activity of Chinese Propolis in Human Breast Cancer MCF-7 and MDA-MB-231 Cells. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, vol. 11, 2014.

HOU, W.; SCHUBERT, M. L. Gastric secretion. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 22, p.593–598, 2006.

HUANG, Q.; SUN, Q.; FAN, X.; ZHOU, D.; ZOU, X. Recent Advances in Proximal Gastric Carcinoma. **J Dig Dis**., 2016.

IGE, A.O.; ADEWOYE, E.O.; OKWUNDU, N.C.; ALADE, O.E.; ONUOBIA, P.C. Oral magnesium reduces gastric mucosa susceptibility to injury in experimental diabetes mellitus. **Pathophysiology**, 23(2):87-93, 2016.

INEU, R.P.; et al. Diphenyl diselenide reverses gastric lesions in rats: involvement of oxidative stress. **Food Chem. Toxicol**, v. 46, p.3023–3029, 2008.

ISHIKAWA, M., et al. Inhibition of growth and induction of apoptosis in human cancer cell lines by propolis. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 94, n. 129, 2004.

JAIN, K.S.; et al. Recent advances in proton pump inhibitors and management of acid-peptic disorders. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v.15, p.1181-1205, 2007.

JUG, Mario; et al. Modulation of antioxidant, chelating and antimicrobial activity of poplar chemo-type propolis by extraction procures. **LWT - Food Science and Technology**, v. 57, n. 2, p.530-537, 2014.

KAKINO, Mamoru; et al. Laxative effects and mechanism of action of Brazilian green propolis. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 12, n. 1, p.192, 2012.

KAMIYA, Tetsuro; et al. Ethanol extract of Brazilian red propolis induces apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through endoplasmic reticulum stress. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, n. 44, p.11065-70, 2012.

KANG, S.Y. et al. Antiviral activities of flavonoids isolated from the bark of *Rhus verniciflua* Stokes against fish pathogenic viruses *In Vitro*. **J Microbiol.**, v. 50, n. 2, p. 293 – 300, 2012.

KATO, S. et al. Normalization of pH level and gastric mucosa after eradication of *H. pylori* in the remnant stomach. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 23, p. 258–261, 2008.

KERMANI, M.; ELIASSI, A. Gastric acid secretion induced by paraventricular nucleus microinjection of orexin A is mediated through activation of neuropeptide Yergic system. **Neuroscience**, v. 226, p. 81-88, dez., 2012.

KOLANKAYAA, Durdane; et al. Protective effects of Turkish propolis on alcohol-induced serum lipid changes and liver injury in male rats. **Food Chemistry**. 78, 213–217, 2002.

KONG, J. et al. Pharmacological characterization of the first in class clinical candidate PF-05190457: a selective ghrelin receptor competitive antagonist with inverse agonism that increases vagal afferent firing and glucose-dependent insulin secretion ex vivo. **Br J Pharmacol**. 173 (9):1452-64, 2016.

KOO, H., et al. Effect of a new variety of *Apis mellifera* propolis on mutants streptococci. **Current Microbiology**, v. 41, p.192–196, 2000.

KOUIDHI, Bochra; ZMANTAR, Tarek; BAKHROUF, Amina. Anti-cariogenic and anti-biofilms activity of Tunisian propolis extract and its potential protective effect against cancer cells proliferation. **Anaerobe**, v.16, n. 6, p.566-571, 2010.

KOTANI, T., et al. Roles of cyclooxygenase-2 and prostacyclin/IP receptors in mucosal defense against ischemia/reperfusion injury in mouse stomach. **J Pharmacol Exp Ther**. 316(2):547-55, 2006.

KOVAC, Suzana; et al. Gastrin increases its own synthesis in gastrointestinal cancer cells via the CCK2 receptor. **FEBS Letters**, v. 584, p.4413–4418, 2010.

KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry**, v. 84, p.329–339, 2004.

LAMMERS, W.J. Inhomogeneities in the propagation of the slow wave in the stomach. **Neurogastroenterol Motil**, v. 27, n.10, p.1349-53, 2015.

LASKAR, Rajibul Arif; et al. Antioxidant activity of Indian propolis and its chemical constituents. **Food Chemistry**, v.122, n. 1, p.233-237, set., 2010.

LEE, O.Y.; et al. A comparative study of DA-9601 and misoprostol for prevention of NSAID-associated gastroduodenal injury in patients undergoing chronic NSAID treatment. **Arch Pharm Res.**,37(10):1308-16, 2014.

LEMOS, Marivane; et al. *Baccharis dracunculifolia*, the main botanical source of Brazilian green propolis, displays antiulcer activity. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 59, n. 4, p.603-608, 2007.

LI, H.J.; et al. Distinct cellular origins for serotonin-expressing and enterochromaffin-like cells in the gastric corpus. **Gastroenterology**, v. 146, p.754-764, 2014.

LIBÉRIO, S. A.; et al. Antimicrobial activity against oral pathogens and Immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, n.108, 2011.

LU, M. Risk Factors Associated with Mortality and Increased Drug Costs in Nonvariceal Upper Gastrointestinal Bleeding. **Hepatogastroenterology**, 62(140):907-12, 2015.

MACLAREN, R. et al. Proton pump inhibitors and histamine-2 receptor antagonists in the intensive care setting: focus on therapeutic and adverse events. **Expert Opin Drug Saf.**, 14(2):269-80, 2015.

MALFERTHEINER, P.; et al. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. **Gut**, v. 56, p. 772-781, 2007.

MARCUCCI, M.C., et al. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, p.105–112, 2001.

MARCUCCI, Maria Cristina; CUSTÓDIO, Ângela Ramalho. **Própolis: correlação química e biológica**. Disponível em: <<http://chemkeys.com/br/2002/10/24/propolis-correlacao-quimica-e-biologica/>>. Acesso em: 30 nov. 2015.

MIGUEL, Maria Graça; et al. Phenols, flavonoids and antioxidant activity of aqueous and methanolic extracts of propolis (*Apis mellifera* L.) from Algarve, South Portugal. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 34, n. 1, p.16-23, 2014.

MILOŠEVIĆ-ĐORĐEVIĆ, Olivera, et al. In vitro chemoprotective and anticancer activities of propolis in human lymphocytes and breast cancer cells. **Archives of Biological Sciences**, v. 67, n. 2, p.571-581, 2015.

MONICI, L. T.; et al. Úlcera péptica. **RBM. Revista Brasileira de Medicina**, Rio de Janeiro, v. 60, p. 25-32, 2003.

MOREIRA, Leandro; et al. Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 11, p.3482-3485, nov., 2008.

MOREIRA, L. L.; et al. Propolis influence on erythrocyte membrane disorder (hereditary spherocytosis): A first approach. **Food and Chemical Toxicology**, 2011, v. 49, n. 2, p.520-526, 2011.

MORTON, M.; PRENDERGAST, C.; BARRETT, T. D. Targeting gastrin for the treatment of gastric acid related disorders and pancreatic câncer. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 32, n. 4, p.201-205, 2011.

MÖSSNER, J.; CACA, K. Developments in the inhibition of gastric acid secretion. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 35, n.8, p.469-475, 2005.

NAGAI, T.; et al. Preparation and antioxidant properties of water extract of propolis. **Food Chemistry**, v. 80, p.29–33, 2003.

NAKAMURA, Tadashi; et al. Protective effect of repeatedly preadministered Brazilian propolis ethanol extract against stress-induced gastric mucosal lesions in rats. **Evidence - Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, 2014.

NOGUEIRA, A.M.C.; et al. Própolis da tíuba (*Melipona compressipes fasciculata* Smith): aspectos químicos e físico-químicos. In: **LVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira Progresso da Ciência**. Brasília (DF), 2004.

NOGUEIRA-NETO, P. **A criação de abelhas indígenas sem ferrão**. São Paulo: Nogueirapis, 1997. 446p.

NUR AZLINA, M.F. et al. Preventive Effects of Tocotrienol on Stress-Induced Gastric Mucosal Lesions and Its Relation to Oxidative and Inflammatory Biomarkers. **PLoS One**. 10(10):e0139348, 2015.

O'MALLEY, P. Gastric ulcers and GERD: the new “plagues” of 21st century update for the clinical nurse specialist. **Clin. Nurse Spec.**, V. 17, p. 286–289, 2003.

OLDONI, Tatiane et al. Isolation and analysis of bioactive isoflavonoids and chalcone from a new type of Brazilian própolis. **Separation and Purification Technology**, V.77 (2), 208-213, 2011

OSAWA, H. et al. *Helicobacter pylori* eradication induces marked increase in H⁺/K⁺-adenosine triphosphatase expression without altering parietal cell number in human gastric mucosa. **Gut**, v. 55, p.152-157, 2006.

PAWLIK, M.W. et al. The renin-angiotensin system and its vasoactive metabolite angiotensin-(1-7) in the mechanism of the healing of preexisting gastric ulcers. The involvement of Mas receptors, nitric oxide, prostaglandins and proinflammatory cytokines. **J Physiol Pharmacol**. 67(1):75-91, 2016.

PHAN, J. et al. Gastric Hypersecretory States: Investigation and Management. **Curr Treat Options Gastroenterol**. 13(4):386-97, 2015.

PRONI, Edson Aparecido; MACIEIRA, Oilton José Dias. Ritmo circadiano da taxa respiratória de *Tetragonisca angustula fiebrigi* (Schwarz), *T. a. angustula* (Latreille) e

Trigona spinipes (Fabricius) (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Rev. Bras. Zool.**, Curitiba, v. 21, n. 4, p. 987-993, 2004.

RAU, T.T.; et al. Gastrin mediated down regulation of ghrelin and its pathophysiological role in atrophic gastritis. **J Physiol Pharmacol**, v. 64, p.719-725, 2013.

RIBEIRO-JUNIOR, Jerônimo Aparecido; et al. Gastroprotective Effect of Geopropolis from *Melipona scutellaris* Is Dependent on Production of Nitric Oxide and Prostaglandin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, 2015.

RODRÍGUEZ-RAMOS, F. et al. Synthesis, docking study and relaxant effect of 2-alkyl and 2-naphthylchromones on rat aorta and guinea-pig trachea through phosphodiesterase inhibition. **Bioorg Chem.**, v. 50, p. 17-25, 2013.

SADEGHI-ALIABADI, Hojjat; HAMZEH, Jamal; MIRIAN, Mina. Investigation of *Astragalus* honey and propolis extract's cytotoxic effect on two human cancer cell lines and their oncogen and proapoptotic gene expression profiles. **Adv Biomed Res**, v. 4, n. 42, 2015.

SAHA, A.; et al. The role of Sp1 in IL-1 beta and *H. pylori*-mediated regulation of H, K- ATPase gene transcription. **American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 295, p. 977–986, 2008.

SAKURAI, T.; MIEDA, M., Connectomics of orexin-producing neurons: interface of systems of emotion, energy homeostasis and arousal. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 32, n. 8, p.451–462, 2011.

SAKURAI, T.; MIEDA, M.; TSUJINO, N. The orexin system: roles in sleep/Wake regulation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1200, p. 149-161, 2010.

SALEEM, T.K. et al. Anti-inflammatory activity of the leaf extracts of *Gendarussa vulgaris* Nees. **Asian Pac J Trop Biomed.**, v.1, n.2, p.147-149, 2011.

SANTOS, C.G.; et al. Caracterização sazonal de acúmulos isolados de própolis em colônias de *Plebeia emerina* (Hymenoptera, Apidae) no sul do Brasil. **Iheringia, Sér Zool.** v. 99, p.200-203, 2009.

SATOH, Kiichi; et al. Evidence-based clinical practice guidelines for peptic ulcer disease 2015. **J Gastroenterol**, v. 51, p.177-194, 2016.

SAVARINO, V. et al. Are proton pump inhibitors really so dangerous? **Dig Liver Dis.** pii: S1590-8658 (16) 30435-2, 2016.

SCHUBERT, M. L. Gastric exocrine and endocrine secretion. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 25, p. 529–536, 2009.

_____. Gastric secretion. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 21, p. 636-643, 2005.

_____. Gastric secretion. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 30, n. 6, p.578-582, 2014.

SFORCIN, José Maurício; BANKOVA, Vassya. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, p.253–260, 2011.

SHENG, Jianchun; et al. Antioxidant activity of ethanol and petroleum ether extracts from Brazilian própolis. **European Food Research and Technology**, v. 225, n. 2, p.249-253, jun., 2007.

SHERWOOD, Lauralee. **Fisiologia Humana: das células aos sistemas**. São Paulo: Cengage Learning, 2011.

SILVA, F.M.; et al. Efficacy of levofloxacin, amoxicillin and a proton pump inhibitor in the eradication of *Helicobacter pylori* in Brazilian patients with peptic ulcers. **Clinics**, v. 70, n. 5, p.318-321, 2015.

SILVA, Luísa Mota. **Mecanismos de ação envolvidos no efeito gastroprotetor do extrato etanólico de *Arctium Lappa* L. em úlceras gástricas crônicas induzidas por ácido acético em ratos**. Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Curitiba: UFPR, 2010.

SILVA, Verónica; et al. Antioxidant activity of uruguayan propolis. In vitro and cellular assays. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, n. 12, p.6430-7, jun., 2011.

SOYBEL, David I. Anatomy and Physiology of the Stomach. **Surg Clin N Am**, v. 85, p. 875-894, 2005.

STANTON, Bruce A.; KOEPPEN, Bruce M. **Berne & Levy: Fisiologia**. 6. ed. São Paulo: Elsevier, 2009.

STEVANOVIC, D.M.; et al. Unacylated Ghrelin Suppresses Ghrelin-Induced Neuronal Activity in the Hypothalamus and Brainstem of Male Rats. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, 2014.

SZABO, S. "Gastric cytoprotection" is still relevant. **J Gastroenterol Hepatol**. 4:124-32, 2014. doi: 10.1111/jgh.12735.

SZLACHIC, Aleksandra; et al. Involvement of Orexigenic Peptides in the Mechanism of Gastric Mucosal Integrity and Healing of Chronic Gastric Ulcers. **Current Pharmaceutical Design**, v. 16, p.1214-1223, 2010.

SZLISZKA, Ewelina; et al. Ethanolic Extract of Polish Propolis: Chemical Composition and TRAIL-R2 Death Receptor Targeting Apoptotic Activity against Prostate Cancer Cells. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.

TACHÉ, Y. Brainstem Neuropeptides and Vagal Protection of the Gastric Mucosal Against Injury: Role of Prostaglandins, Nitric Oxide and Calcitonin-Gené Related Peptide in Capsaicin Afferents. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, p.35-42, 2012.

TALLEY, N.J. Functional dyspepsia: new insights into pathogenesis and therapy. **Korean J Intern Med**, 31(3):444-56, 2016.

TAKEUCHI, K. Prostaglandin EP receptors and their roles in mucosal protection and ulcer healing in the gastrointestinal tract. **Adv Clin Chem**. 51:121-44, 2010.

TAKEUCHI, K. Pathogenesis of NSAID-induced gastric damage: importance of cyclooxygenase inhibition and gastric hypermotility. **World J Gastroenterol**. 18(18):2147-60, 2012.

TARNAWSKI, A. et al. Gastric cytoprotection beyond prostaglandins: cellular and molecular mechanisms of gastroprotective and ulcer healing actions of antacids. **Curr Pharm Des**. 19(1):126-32, 2013.

TEERASRIPREECHA, Dungporn; et al. In vitro antiproliferative/cytotoxic activity on cancer cell lines of a cardanol and a cardol enriched from Thai *Apis mellifera* propolis. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 12, n. 27, 2012.

THOMSEN R.W. et al. Outcome of peptic ulcer bleeding among users of traditional non-steroidal anti-inflammatory drugs and selective cyclo-oxygenase-2 inhibitors. **Aliment Pharmacol Ther**. 24(10):1431-8, 2006.

TONETO, Marcelo Garcia; OLIVEIRA, Fábioerson João Mocelin; LOPES, Maria Helena Itaqui. Evolução histórica da úlcera péptica: da etiologia ao tratamento. **Scientia Medica**, Porto Alegre, v. 21, n. 1, p. 23-30, 2011.

TYSZKA-CZOCHARA, Małgorzata; et al. Zinc and Propolis Reduces Cytotoxicity and Proliferation in Skin Fibroblast Cell Culture: Total Polyphenol Content and Antioxidant Capacity of Propolis. **Biological Trace Element Research**, v.160, n.1, p.123-131, 2014.

UEMURA, N.; et al. *Helicobacter* infection and the development of gastric cancer. **N Engl J Med**, v. 345, p.784-89, 2001.

UMTHONG, S.; et al. In vitro antiproliferative activity of partially purified *Trigona laeviceps* propolis from Thailand on human cancer cell lines. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, n. 37. 2011.

VALENCA, Isabel; et al. Portuguese propolis disturbs glycolytic metabolism of human colorectal cancer in vitro. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, p.184, 2013.

VALENTE, Maria J.; et al. Biological activities of Portuguese propolis: Protection against free radical-induced erythrocyte damage and inhibition of human renal cancer cell growth in vitro. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 1, p.86-92,

2001.

VARGAS-SÁNCHEZ, R.D.; et al. Antioxidant and antimicrobial activity of commercial propolis extract in beef patties. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 8, p.1499-1504. Ago. 2014.

VENTURIERI, G.C.; RAIOL, V.F.O.; PEREIRA, C.A.B. Avaliação da introdução da criação racional de *Melipona fasciculata* (Apidae, Meliponina), entre os agricultores familiares de Bragança, PA, Brasil. **Biotropica**, v. 2, p.1-7, 2003.

VILLAS-BÔAS, Jerônimo. Manual Tecnológico: Mel de Abelhas sem Ferrão. Brasília – DF. Instituto Sociedade, População e Natureza (ISPN). Brasil, 2012.

WAKIM, S.A.; AHMED, M.A.; ALI, R.H. Gastric acid secretion in experimental acute uremia. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 91, p.693-699, 2013.

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

WANG, F. et al. *Helicobacter pylori* VacA disrupts apical membrane-cytoskeletal interactions in gastric parietal cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, p. 26714–26725, set. 2008.

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

YAMAZAKI, K.; et al. Importance of muscarinic acetylcholine receptor subtype 4 in carbachol-induced gastric acid secretion in mice. **Journal Of Pharmacological Sciences**, v. 109, Supl. 1, p.181-181, 2009.

YANG, Z.C. Stereoselective Pharmacodynamics and Pharmacokinetics of Proton Pump Inhibitors. **Curr Drug Metab.**, v.17, n.10, 2016.

YANG, S. et al. Encapsulation of propolis flavonoids in a water soluble polymer using pressurized carbon dioxide anti-solvent crystallization. **The Journal of supercritical fluids.**, v. 94, p.138-146, 2014.

YAO, X.; FORTE, J.G. Cell biology of acid secretion by the parietal cell. **Annu. Rev. Physiol**, v. 65, p.103–31, 2003.

YOON, Hyuk; et al. Optimal initiation of *Helicobacter pylori* eradication in patients with peptic ulcer bleeding. **World journal of gastroenterology**, v. 21, n. 8, p.2497-2503, fev. 2015.

ZAKI, M.; et al. *H. pylori* acutely inhibits gastric secretion by activating CGRP sensory neurons coupled to stimulation of somatostatin and inhibition of histamine secretion. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 304, p.715-722, 2013.

ZHANG, Y-M.; et al. *Helicobacter pylori*-induced posttranscriptional regulation of H-K-

ATPase [alpha]-subunit gene expression by miRNA. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 306, p.606-613, 2014.

ZHANG, W.D., et al. Clinical treatment of gastrinoma: A case report and review of the literature. **Oncol Lett.** 11(5):3433-3437, 2016.

ZHANG, C.M. et al. Up-regulation of the Ang II/AT1 receptor may compensate for the loss of gastric antrum ICC via the PI3k/Akt signaling pathway in STZ-induced diabetic mice. **Molecular and Cellular Endocrinology**, "in press", 2016.

Apêndices

APÊNDICES

A. Efeito da administração oral do EHG durante 14 dias sobre o consumo de água e ração dos ratos no modelo de úlcera induzida por ácido acético.

B. Efeito da administração oral do EHG durante 14 dias sobre o a evolução ponderal dos ratos (1º, 7º e 14º dia) no modelo de úlcera induzida por ácido acético.

C. Efeito da administração oral de EHG durante 14 dias sobre os parâmetros hematológicos em ratos no modelo de úlceras induzidas por ácido acético.

D. Efeito da administração oral de EHG durante 14 dias sobre os parâmetros bioquímicos em ratos no modelo de úlceras induzidas por ácido acético.

APÊNDICE A:

Efeito da administração oral do EHG durante 14 dias sobre o consumo de água e ração dos ratos no modelo de úlcera induzida por ácido acético.

Grupo	Consumo médio de água/ grupo (mL)	Consumo médio de ração/grupo (g)
Controle	32,9±5,2	77,5±34,3
Pantoprazol	33,8±7,1	61,9±27,9
EHG 100 mg/Kg	26,7±7,9	68,9±31,7

Valores expressos como média ± S.E.M (n= 6 ratos por grupo). Os asteriscos indicam valores significativos quando comparados com o grupo controle.

* $p \leq 0,05$ EHG, utilizando one-way ANOVA, seguida do teste de Tukey.

APÊNDICE B:

Efeito da administração oral do EHG durante 14 dias sobre o a evolução ponderal dos ratos (1^o, 7^o e 14^o dia) no modelo de úlcera induzida por ácido acético.

Grupo		Peso – dia 1 (g)	Peso – dia 7 (g)	Peso – dia 14 (g)	Variação (%)
Controle	Machos	242±3,6	247,8±12,9	254,2±4,3	5,0
	Fêmeas	218,1±0,9	221,1±2,3	228,3±1,9	4,7
Pantoprazol	Machos	202,2±2,0	235,3±1,2	244,1±7,2	20,7
	Fêmeas	191,8±2,5	226,4±3,3	231,1±0,5	20,4
EHG 100 mg/Kg	Machos	208,9±1,5	216,5±2,7	221,3±2,0	5,9
	Fêmeas	195,2±1,5	204±2,9	211,0±0,9	8,1

Valores expressos como média ± S.E.M (n= 6 ratos por grupo). Os asteriscos indicam valores significativos quando comparados com o grupo controle.

*p≤0,05 EHG, utilizando one-way ANOVA, seguida do teste de Tukey.

APÊNDICE C:

Efeito da administração oral de EHG durante 14 dias sobre os parâmetros hematológicos em ratos no modelo de úlceras induzidas por ácido acético.

	Controle	Pantoprazol	EHG 100 mg/Kg
Total Eritrócitos (milhões/mm ³)	7,1±0,45	8,2±0,2	8,1±0,4
Hemoglobina (g/dL)	14,2±0,4	15,2±0,3	15,1±0,6
Hematócrito (%)	48,8±1,9	51,4±0,5	50,3±1,9
VCM (fL)	69,5±3,0	62,9±0,9	62,6±1,0
HCM (pg)	20,3±1,1	18,6±0,2	18,8±0,2
CHCM (%)	29,1±0,3	29,6±0,4	30,0±0,5
RDW (%)	15,9±0,8	15,8±0,4	16,3±0,6
Total Leucócitos (x10 ³ /mm ³)	3,8±0,4	4,6±0,6	10,4±2,7
Neutrófilos (%/mm ³)	4,7±1,0	5,6±0,9	3,5±0,9
Linfócitos (%/mm ³)	89,2±1,0	86,2±2,0	89,1±1,4
Eosinófilos (%/mm ³)	3,9±0,3	3,9±0,4	4,2±0,3
Monócitos (%/mm ³)	2,2±0,3	4,3±1,3	3,3±0,7
Total Plaquetas (x10 ³ /mm ³)	675,5±56,9	634,2±34,2	756,6±47,8
Plaquetócrito (%)	0,4±0,03	0,4±0,02	0,5±0,06
VPM (fL)	6,4±0,2	6,5±0,1	6,4±0,2
PDW (%)	9,6±0,3	9,7±0,2	9,5±0,2

Valores expressos como média ± S.E.M (n= 6 ratos por grupo). Os asteriscos indicam valores significativos quando comparados com o grupo controle.

*p≤0,05 EHG, utilizando one-way ANOVA, seguida do teste de Tukey.

APÊNDICE D:

Efeito da administração oral de EHG durante 14 dias sobre os parâmetros bioquímicos em ratos no modelo de úlceras induzidas por ácido acético.

Parâmetros Bioquímicos	Controle	Pantoprazol	EHG 100 mg/Kg
Proteínas Totais (g/dL)	7,7±0,4	7,3±0,4	8,1±0,4
Albumina (g/dL)	3,6±0,4	3,5±0,2	3,4±0,3
Uréia (mg/dL)	54,9±3,4	68,6±2,5	67,5±4,2
Ácido úrico (mg/dL)	1,3±0,2	1,3±0,1	1,4±0,2
Fosfatase Alcalina (U/L)	53,8±7,0	68,8±7,8	65,4±9,7
ALT (U/L)	91,9±17,4	83,2±7,2	84,5±10,8
AST (U/L)	355,2±26,8	387,8±16,9	373,6±14,7
Colesterol Total (mg/dL)	82,4±11,9	102,2±11,2	123,4±8,8*
Colesterol HDL (mg/dL)	25,3±3,9	38,2±10,4	24,8±4,3
Triglicerídeos (mg/dL)	37,4±2,0	39,1±5,8	50,5±4,7*

Valores expressos como média ± S.E.M (n= 6 ratos por grupo). Os asteriscos indicam valores significativos quando comparados com o grupo controle.

* $p \leq 0,05$ EHG, utilizando one-way ANOVA, seguida do teste de Tukey.

Anexos

ANEXOS


A. Cópia da aprovação do projeto no Comitê de Ética (CEUA – UFMA)

B. Cópia do comprovante do pedido de depósito da patente “COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS PARA DISTÚRBIOS GÁSTRICOS A BASE DE GEOPRÓPOLIS”.

C. Normas para submissão de artigo ao periódico “*European Journal of Pharmacology*”

D. Normas para submissão de artigo ao periódico “*Journal of Ethnopharmacology*”.

ANEXO A: Cópia da aprovação do projeto no Comitê de Ética (CEUA – UFMA)

 UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	
PARECER CONSUBSTANCIADO INICIAL	Nº do parecer: 08
PROJETO DE PESQUISA	Registro da CEUA: 08/14
	Nº do Protocolo: 23115.007041/2014-48
	Data de entrada na CEUA: 23/05/2014
	Parecer: APROVADO COM RECOMENDAÇÕES

I – Identificação

Título do projeto: AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIULCEROGÊNICA E GASTROPROTETORA DE EXTRATO E FRAÇÕES DO GEOPRÓPOLIS DE <i>Melipona fasciculata</i> Smith (TIÚBA)		
Identificação da equipe executora: Débora Luana Ribeiro Pessoa, Antonio Carlos Romão Borges, Maria do Socorro de Sousa Cartágenes, Marilene Oliveira da Rocha Borges, Sônia Maria Farias Freire, Denilson Amorim Vieira		
Instituição onde será realizado: UFMA		
Área temática: Não se aplica	Multicêntrica: Não	Data de recebimento: 28/08/14
Cooperação estrangeira:		Data de devolução: 28/08/14

II – Objetivos:

Objetivo geral:

-Avaliar a atividade farmacológica do extrato de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith (TIÚBA) na mucosa gástrica de roedores.

Objetivos específicos

- Verificar a ação do extrato do geoprópolis em modelos experimentais de úlcera gástrica induzidas em ratos e camundongos por Indometacina ou etanol;
- Investigar o efeito do extrato na secreção gástrica e na produção de muco pela mucosa gástrica de ratos e camundongos;
- Avaliar o efeito do extrato do geoprópolis na citoproteção gástrica de roedores; Identificar frações e/ou compostos com atividade antiulcerogênica e gastroprotetora através de fracionamento biomonitorado dos extratos do geoprópolis.

III – Sumário do projeto:

O tratamento farmacológico da úlcera péptica já apresenta muitos avanços, no entanto a resposta limitada de alguns pacientes ao tratamento e os efeitos colaterais constituem-se em desvantagens frente ao tratamento farmacológico adotado na atualidade. Vários estudos indicam que os componentes ativos presentes na própolis e em seus derivados são utilizados para o tratamento de doenças estomacais. Considerando que no estado do Maranhão popularmente os derivados de *Melipona fasciculata* Smith (TIÚba) são bastante utilizados para patologias gástricas, e que a literatura científica não refere estudos que demonstrem a

atividade do geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith no trato gastrointestinal, o estudo pretende fornecer resultados que permitam avaliar a utilização deste componente como alternativa na obtenção de novos medicamentos. Os seguintes modelos experimentais serão utilizados: lesões gástricas induzidas por indometacina e por etanol em animais submetidos a um jejum médio de 16 horas serão separados em grupos e receberão por via oral extrato de geoprópolis, omeprazol (20 mg/kg) ou veículo. Após uma hora os animais receberão indometacina (10 mg/kg) ou etanol a 75%, de acordo com a técnica empregada. Em seguida os estômagos serão retirados e serão realizadas a análise macroscópica e avaliação histológica das lesões. Também será avaliada a produção do muco da mucosa gástrica, onde após jejum de 16 horas os animais serão tratados por via oral com extrato de geoprópolis, misoprostol (100 µg/kg) ou veículo. Após uma hora, os segmentos glandulares dos estômagos serão removidos, pesados e mantidos em uma solução de Alcian blue 1%. Após lavagens sucessivas as concentrações de Alcian Blue complexadas com o muco serão determinadas. Na avaliação da secreção ácida basal os animais separados em grupos receberão por via intraduodenal geoprópolis, omeprazol (20 mg/kg) ou veículo. O lavado gástrico será recolhido, haverá a determinação do volume, da acidez livre em pHmetro e da acidez total por titulação com solução de NaOH 0,1N. A participação do óxido nítrico (NO) e dos grupamentos sulfidríla (SH) na citoproteção também serão avaliadas.

IV – Comentário do relator frente à resolução 778 de 28 de agosto de 2010 e complementares em particular sobre:

O atual projeto será realizado nas dependências do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), no Laboratório de Pesquisa e Pós-Graduação em Farmacologia. A sua vigência será de 24 meses a iniciar após a aprovação desta comissão. O projeto está orçado em 8 mil reais e será financiado por recursos disponíveis de projetos anteriores do grupo. O projeto está conciso e coerente quanto aos seus objetivos. Serão utilizados ratos e camundongos machos e fêmeas, com idade entre 45 e 60 dias. Segundo o cálculo amostral do pesquisador, serão utilizados 40 animais por experimento provenientes do Biotério Central da UFMA. Os métodos a serem utilizados estão claros e são baseados em artigos publicados em revistas conceituadas, mas não estão muito claros a espécie animal a ser utilizada em cada método. Os animais não serão expostos a estresse e serão eutanasiados por excesso de CO₂. Os animais remanescentes não serão usados para outro fim.

V – Pendências

Não há pendências

VI – Recomendações:

- Esclarecer qual espécie será usada em cada método de úlcera gástrica
- Estas recomendações não inviabilizam o início da execução dos experimentos.

VII – Parecer concubscunolado da CEUA

O projeto intitulado AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIULCEROGÊNICA E GASTROPROTETORA DE EXTRATO E FRAÇÕES DO GEOPRÓPOLIS DE *Melipona fasciculata* Smith (TIÚBA) utilizará 40 ratos e 40 camundongos, no período de dois anos, e foi considerado APROVADO pela CEUA/UFMA.

São Luis, _26_/_03_/_15_



Prof. Dra. Lucilene Amorim Silva

Presidente da CEUA / UFMA

**ANEXO B: Cópia do comprovante do pedido de depósito da patente
“COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS PARA DISTÚRBIOS GÁSTRICOS A BASE
DE GEOPRÓPOLIS”**



**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2016 010613 3

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: Universidade Federal do Maranhão

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 06279103000119

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av. dos Portugueses, 1966 - Cidade Universitária, Bacanga

Cidade: São Luis

Estado: MA

CEP: 65080-805

País: Brasil

Telefone: (98) 32728710

Fax:

Email: nit-dapi@ufma.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): "COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS PARA DISTÚRBIOS
GÁSTRICOS A BASE DE GEOPRÓPOLIS"

Resumo: A presente invenção trata-se de composições farmacêuticas a base de extrato liofilizado de geoprópolis e seu uso no auxílio do tratamento de distúrbios gástricos, como alternativa de origem natural eficiente sem a complexidade das formulações e os significativos efeitos adversos apresentados pelos tratamentos convencionais de combate a gastrites e úlceras pépticas.

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 5**Nome:** DÉBORA LUANA RIBEIRO PESSOA**CPF:** 64652519349**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Física:** Enfermeiro de nível superior, nutricionista, farmacêutico e afins**Endereço:** RUA 20, QUADRA 09, CASA 14, CENTRAL PARK-ARAÇAGY**Cidade:** SÃO JOSÉ DE RIBAMAR**Estado:** MA**CEP:** 65110-000**País:** BRASIL**Telefone:** (98) 988 535829**Fax:****Email:** debbyeluna2@yahoo.com.br**Inventor 2 de 5****Nome:** MARILENE OLIVEIRA DA ROCHA BORGES**CPF:** 22729860215**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Física:** Enfermeiro de nível superior, nutricionista, farmacêutico e afins**Endereço:** RUA OSIRES, 6. EDIFÍCIO EL GRECO, APTO. 602, JARDIM
RENASCENÇA**Cidade:** SÃO LUÍS**Estado:** MA**CEP:** 65975-775**País:** BRASIL**Telefone:** (98) 992 224445**Fax:****Email:** rocha.marliene@ufma.br**Inventor 3 de 5**

Nome: ANA KELY ARAÚJO SOUSA

CPF: 02730097376

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Enfermeiro de nível superior, nutricionista, farmacêutico e afins

Endereço: Alameda 6, Condomínio Buena Vista, Bloco N, Apt.303. Bequimão.

Cidade: SÃO LUIS

Estado: MA

CEP: 65051-550

País: BRASIL

Telefone: (98) 981 737648

Fax:

Email: rocha.marlene@ufma.br

Inventor 4 de 5

Nome: ANTONIO CARLOS ROMÃO BORGES

CPF: 23718331349

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Enfermeiro de nível superior, nutricionista, farmacêutico e afins

Endereço: RUA OSIRES, 6. EDIFÍCIO EL GRECO, APTO. 602, JARDIM
RENASCENÇA

Cidade: SÃO LUIS

Estado: MA

CEP: 65075-775

País: BRASIL

Telefone: (98) 992 084446

Fax:

Email: romao.antonio@ufma.br

Inventor 5 de 5

Nome: MARIA NILCE SOUSA RIBEIRO

CPF: 03211908234

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Enfermeiro de nível superior, nutricionista, farmacêutico e afins

Endereço: AVENIDA DOS HOLANDESES, 1. EDIFÍCIO TOM JOBIM, APTO.
202, CALHAU

Cidade: SÃO LUÍS

Estado: MA

CEP: 65071-380

País: BRASIL

Telefone: (98) 988 427475

Fax:

Email: mnribeiro@ufma.br

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Relatório Descritivo	RELATÓRIO DESCRITIVO.pdf
Reivindicação	REIVINDICACOES.pdf
Resumo	RESUMO.pdf
Comprovante de pagamento de GRU 200	COMPROVANTE DE PAGAMENTO.pdf

Acesso ao Patrimônio Genético

- Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de Invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

Declaração de veracidade

- Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.