



**BRUNA DE PAOLI STEIN**

**EFEITO PRÉ-CLÍNICO CICATRIZANTE GÁSTRICO DA  
BOLDINA**

Itajaí (SC)  
2019



**UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAÍ**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS**  
**FARMACÊUTICAS**  
**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E**  
**SUBSTÂNCIAS SINTÉTICAS BIOATIVAS**

**BRUNA DE PAOLI STEIN**

**EFEITO PRÉ-CLÍNICO CICATRIZANTE GÁSTRICO DA**  
**BOLDINA**

Dissertação submetida à Universidade do Vale do Itajaí como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Luisa Mota da Silva

Itajaí (SC)  
Agosto de 2019

## FICHA CATALOGRÁFICA

S34e Stein, Bruna de Paoli. 1992-  
Efeito pré-clínico cicatrizante gástrico da boldina [Manuscrito] /  
Bruna de Paoli Stein. – 2019.  
70 f. : il., tab., graf., fig. color. : 21 cm.

Cópia de computador (Printout(s)).

Dissertação (mestrado) – Universidade do Vale do Itajaí,  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas Área  
de Concentração em Produtos Naturais e Substâncias Sintéticas  
Bioativas 2019.

“Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Luisa Mota da Silva ;  
Bibliografia: f. 60 -70.

1. Alcaloides. 2. Úlcera gástrica. 3. Cicatrização. 4. Peumus  
Boldus. I. Silva, Luisa Mota da. II. Título.

CDU: 615.32



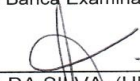
**“EFEITO PRÉ-CLÍNICO CICATRIZANTE GÁSTRICO DA BOLDINA”.**


**BRUNA DE PAOLI STEIN**

Esta Dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Produtos Naturais e Substâncias Bioativas e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade do Vale do Itajaí.


  
 Professor Cláudio Antônio Rodrigues, Doutor  
 Coordenador PPGCF

Apresentada perante a Banca Examinadora composta pelos Professores:

  
 Prof<sup>ª</sup>. Dra. LUISA MOTA DA SILVA (UNIVALI) – Presidente e Orientadora

  
 Prof. Dr. RIVALDO NIERO (UNIVALI) – Membro Interno

  
 Prof<sup>ª</sup>. Dra. PRISCILA DE SOUZA (UNIVALI) – Membro Interno

  
 Prof<sup>ª</sup>. Dra. LÍGIA MOURA BURCI (Faculdade Herrero) – Membro Externo

Itajaí, 01 de agosto de 2019.



**Dedico**  
**Àqueles que sofrem, já sofreram ou**  
**ainda sofrerão por conta da úlcera.**  
**Que eu possa ter contribuído, o mínimo**  
**que seja, para um futuro melhor no**  
**que se refere a essa patologia .**

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Maria Cláudia De Paoli Faria e Marcos Stein pelo apoio incondicional

Ao meu irmão Daniel De Paoli Stein por me mostrar que eu sempre sou capaz de realizar aquilo ao qual me proponho, mesmo quando nem eu acredito nisso.

A minha melhor amiga, Clarissa, pelo apoio, pelo exemplo de persistência e por estar presente tanto nos bons momentos quanto nos momentos mais difíceis.

Ao departamento de Farmacologia e à Universidade do Vale do Itajaí pela oportunidade.

A CAPES pelo apoio financeiro

Aos companheiros de Laboratório Mariana, Lincon, Larissa, Thaise, Rita, Priscila, Viviane, Sérgio, Luisa, Marihá e Mariane no auxílio dos experimentos e aprendizado mútuo.

A Prof<sup>ª</sup>. Dra. Luisa Mota da Silva, minha orientadora pela paciência e pelos ensinamentos.

Ao Prof<sup>º</sup> Msc Alexandre Geraldo, exemplo de profissional que muito admiro.

Ao Prof<sup>º</sup> Dr. Luiz Carlos Klein Júnior pelo ótimo suporte com as análises fitoquímicas.

A Deus, pela vida e tudo de Bonito que há nela.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho e que em algum momento fizeram parte da grande equipe que me auxiliou durante a execução deste estudo meu sincero obrigada!





**“Diga-me, e eu me esquecerei, ensina-me e eu poderei lembrar,  
envolva-me e eu aprenderei.”**

**Benjamin Franklin**



# EFEITO PRÉ-CLÍNICO CICATRIZANTE GÁSTRICO DA BOLDINA.

**Bruna De Paoli Stein**

Agosto/2019

Orientador: Prof. Dr. Luisa Mota da Silva

Área de Concentração: Produtos Naturais e Substâncias Sintéticas Bioativas.

Número de Páginas:70.

Resumo: *Peumus Boldus* Molina, conhecida popularmente como Boldo-do-chile, tem sido utilizado no tratamento de patologias gastrointestinais. Assim o objetivo do presente trabalho foi avaliar pré-clinicamente o potencial cicatrizante gástrico da Boldina. Inicialmente, sua atividade gástrica protetora foi avaliada e comprovada por estudos do grupo de pesquisa, desta forma foi necessário realizar estudo sobre seu efeito cicatrizante, no modelo de úlcera induzida por ácido acético 80% em ratos, com tratamento por 7 dias, 2 vezes ao dia. O controle positivo utilizado no modelo nesse trabalho foi o Omeprazol (20 mg/kg). Neste modelo, também foram analisados o conteúdo de mucina pelo método histoquímico de PAS, atividade da mieloperoxidase (MPO), e parâmetros do estresse oxidativo (Glutathione reduzida – GSH, Catalase - CAT, superóxido dismutase- SOD). Os efeitos sobre a secreção ácida gástrica foram avaliados pelo método de ligadura do piloro sem estímulo de secretagogos, onde o muco aderido foi quantificado e atividade péptica foi mensurada. No modelo de úlcera crônica induzida por ácido acético 80% a Boldina (100 mg/kg) reduziu de maneira significativa as lesões (60 %). Já o tratamento com Omeprazol também reduziu a área ulcerada em 70%. Em relação as mucinas houve aumento em 43% comparados com o grupo veículo. A respeito os parâmetros do estresse oxidativo, a administração oral de Boldina, não reverteu à depleção do conteúdo de GSH; contudo normalizou a atividade da SOD e MPO, e aumentou em 64% a atividade de CAT, comparado ao grupo não ulcerado. Apesar desses efeitos, a administração intraduodenal de Boldina em animais submetidos a ligadura pilórica não alterou o volume e a acidez da secreção gástrica, porém reduziu tanto *in vivo* como em *in vitro* a atividade péptica. Em

conjunto, nossos dados demonstram o efeito cicatrizante gástrico da Boldina associado ao aumento de fatores protetores da mucosa gástrica (em especial as mucinas) e ao favorecimento de defesas antioxidantes. Contudo, mais estudos são necessários para a contínua elucidação de mecanismos envolvidos na atividade gastroprotetora e cicatrizante gástrica da Boldina.

**Palavras-chave** Alcaloide. Boldina. Cicatrização. Úlcera gástrica.

# PRECLINICAL GASTRIC HEALING EFFECT OF BOLDINE

**Bruna De Paoli Stein**

August /2019

Supervisor: Luiza Mota da Silva, PhD

Area of concentration: Natural Products and Synthetic Bioactive Substances

Number of Pages:70

**ABSTRACT:** *Peumus Boldus Molina*, popularly known as Boldo-do-Chile in Brazil, has been used in the treatment of gastrointestinal pathologies. Thus, the objective of this study is to evaluate the gastric healing potential of Boldine. Initially, its protective gastric activity was evaluated in studies of the research group, so it was necessary to carry out further studies of its healing effect using the model of 80% acetic acid-induced ulcer in rats after treatment for 7 days, twice a day. The positive control used in the models in this study was omeprazole (20 mg/kg). We also analyzed the content of mucin by the histochemical method of PAS, myeloperoxidase activity (MPO), and oxidative stress parameters (glutathione reduced-GSH, Catalase-CAT, superoxide dismutase-SOD). The effects on gastric secretion were evaluated by the method of pylorus ligation without stimulation of secretagogues, where the adhered mucus was quantified and the peptic activity was measured. In the model of chronic ulcer induced by 80% acetic acid, Boldine (100 mg/kg) significantly reduced the lesions by 60%. Treatment with Omeprazole reduced the ulcerated area by 70%. There was an increase in the mucin group at 43% compared to the vehicle group. Regarding the parameters of oxidative stress, in addition, oral administration of Boldine didn't revert to the depletion of GSH content; however, it normalized the activity of SOD and MPO and increased by 64% the CAT activity compared to the non-ulcerated group. Despite these effects, the intraduodenal administration of Boldine in animals submitted to pyloric ligation did not alter the volume and acidity of the gastric secretion, although it reduced both in vivo and in vitro peptic activity. Together, our data demonstrated the gastric healing effect of Boldine associated to the increase of protective factors of the gastric mucosa (especially the mucins) and the favoring of antioxidant defenses. However, further studies are needed for the continuous clarification of mechanisms involved in the gastroprotective and gastric healing activities of Boldine.

**Keywords** Alkaloid. Boldine. Healing. Gastric ulcer.



## Sumário

Lista de figuras .....	18
Lista de abreviaturas.....	19
Lista de tabelas .....	21
1 INTRODUÇÃO .....	22
2 OBJETIVOS.....	24
2.1 Objetivo Geral .....	24
2.2 Objetivos específicos .....	24
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	26
3.1 Plantas Medicinais.....	26
3.2 <i>Peumus Boldus</i> Molina.....	27
3.3 Boldina.....	29
3.4 Efeitos Farmacológicos da Boldina .....	30
3.5 Aspectos anatômicos e histológicos do estômago .....	33
3.6 Fatores protetores da mucosa gástrica .....	34
3.7 Fatores agressores da mucosa gástrica.....	36
3.8 Controle da secreção ácida gástrica .....	37
3.9 Úlcera gástrica .....	39
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
4.1 Obtenção da Boldina e escolha da dose .....	41
4.2 Animais .....	41
4.3 Modelo de úlcera induzidas por ácido acético em ratos.....	41
4.4 Avaliação histopatológica .....	42
4.5 Avaliação histoquímica do conteúdo das mucinas.....	42
4.6 Preparação da fração subcelular gástrica .....	42
4.7 Quantificação dos níveis de GSH.....	43
4.8 Determinação da atividade de SOD e CAT.....	43
4.9 Quantificação da atividade de GST.....	43
4.10 Determinação da atividade de MPO <i>in vivo</i> .....	44
4.11 Ligadura do piloro .....	44
4.12 Quantificação da atividade péptica <i>in vivo</i> .....	44
4.13 Quantificação da atividade péptica <i>in vitro</i> .....	45
5.0 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
6.0 RESULTADOS.....	46
6.1 Efeito da administração oral de Boldina sobre a área ulcerada.....	46
6.2 Efeito da administração oral de Boldina sobre os níveis de mucina no sítio da úlcera.....	46
6.3 Efeito da Boldina sobre a atividade da enzima SOD no sítio da úlcera.....	49
6.4 Efeito da Boldina sobre a atividade da enzima SOD no sítio da úlcera.....	49



6.5 Efeito do alcaloide Boldina sobre a atividade da enzima CAT no sítio úlcera.....	50
6.6 Efeito da Boldina sobre os níveis da atividade de GST no sítio da úlcera.....	50
6.7 Efeito da Boldina sobre os níveis da atividade de GST no sítio da úlcera.....	51
6.8 Efeito da administração intraduodenal de Boldina sobre a secreção ácida gástrica de ratos .....	52
6.9 Efeito in vivo da administração de boldina na atividade péptica.....	53
7.0 Efeito in vitro da incubação com alcaloide boldina na atividade péptica.....	54
8 DISCUSSÃO .....	56
9 CONCLUSÃO .....	62
10 REFERÊNCIAS.....	63

## Lista de figuras

<b>FIGURA 1:</b> Foto ilustrativa do boldo-do-chile.....	26
<b>FIGURA 2:</b> Estrutura química da Boldina.....	28
<b>FIGURA 3:</b> Principais partes anatômicas do Estômago.....	32
<b>FIGURA 4:</b> Mecanismos de secreção ácida gástrica.....	36
<b>FIGURA 5:</b> : Efeito da administração oral de Boldina sobre a área da úlcera induzida por ácido acético em ratos.....	44
<b>FIGURA 6:</b> Efeito da administração oral de Boldina sobre os níveis de mucina no sítio da úlcera.....	45
<b>FIGURA 7:</b> Atividade da administração oral da Boldina sobre a atividade de MPO notecido ulcerado.....	48
<b>FIGURA 8:</b> Efeito da administração de Boldina (100 mg/kg, i,d) na atividade péptica <i>in vivo</i> .....	50
<b>FIGURA 9:</b> Efeito da administração do alcaloide Boldina na atividade péptica <i>in vitro</i> .....	51

## Lista de abreviaturas

- AA**- ácido araquidônico  
**AINE'S**- Antiinflamatórios não esteroidais  
**AMPc**- 3'5'-adenosina-monofosfato-cíclico  
**ATC** – Ácido tricloroacético  
**CAT**- catalase  
**CCK<sub>2</sub>**- Receptores para colecistocinina do tipo 2  
**COX<sub>1</sub>**- Ciclooxigenase do tipo 1  
**CDNB** - Conjugação do dicloro-nitro-benzeno  
**ECL**- Célula tipo enterocromafins  
**EDTA**- Ácido etilenodiamino tetra-acético  
**EP<sub>1</sub>**-Receptores de prostaglandina do tipo 1  
**EP<sub>2</sub>**- Receptores de prostaglandina do tipo 2  
**EP<sub>3</sub>**- Receptores de prostaglandina do tipo 3  
**EP<sub>4</sub>**- Receptores de prostaglandina do tipo 4  
**ERO's**- espécies reativas de oxigênio  
**GPX**- glutationa peroxidase  
**GSH**- glutationa reduzida  
**GSSG**- Glutationa oxidada  
**GST** - Glutationa S-transferase  
**GR** – Glutationa redutase  
**H<sup>+</sup> K<sup>+</sup> ATPase** – Bomba hidrogênio, potássio ATPase  
**RH<sub>2</sub>** – Receptor do tipo 2 da Histamina  
**HDC**- Histidina Descarboxilase  
***H. Pylori*** - *Helicobacter Pylori*  
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** - Peróxido de Hidrogênio  
**IBPS** - Inibidores da Bomba de prótons  
**LDH**- Lactato Desidrogenase  
**M<sub>3</sub>** – Receptores muscarínicos do tipo 3  
**MPO** - Mieloperoxidase  
**NO** - óxido nítrico  
**O<sup>2-</sup>** - ânion superóxido  
**PPAR $\gamma$**  – Receptores ativados pelo proliferador de peroxissoma  
**PGs** - Prostaglandinas  
**PGE<sub>2</sub>** - prostaglandina E<sub>2</sub>  
**PGI<sub>2</sub>** - Prostaciclina I<sub>2</sub>  
**SOD** - superóxido dismutase  
**TRIS** – Tris (hidroximetil) aminometano

**TXA<sub>2</sub>** – Tromboxano

**V.O** - Via oral

## Lista de tabelas

<b>Tabela 1:</b> Efeito da Boldina em parâmetros de estresse oxidativo na mucosa gástrica ulcerada por ácido acético.....	47
<b>Tabela 2:</b> Tabela 2: Efeito da administração intraduodenal de Boldina sobre a secreção gástrica de ratos.....	49

# 1 INTRODUÇÃO

O Boldo-do-chile (*Peumus boldus* Molina) é uma espécie arbórea, pertencente à família Monimiaceae e nativa das regiões central e sul do Chile, onde ocorre abundantemente. Suas folhas são usadas na medicina popular para o tratamento de problemas digestivos e hepáticos. Além do uso popular, preparações a base de boldo-do-chile são descritas em vários textos farmacognósticos oficiais (DE ALMEIDA, MELO, XAVIER, 2000).

O Boldo-do-Chile possui folhas grossas de sabor amargo que resistem a verões secos e invernos frios e chuvosos, também pode ser encontrado como vegetação nativa no Marrocos e é atualmente cultivado em vários países como Itália, Brasil e norte da África, produz pequenos frutos redondos e esverdeados, os quais são comestíveis e de sabor agradável (WILLIAMSON; DRIVER; BAXTER, 2012). Além disso, seus principais constituintes químicos bioativos são alcalóides, cujo representante majoritário é a Boldina (BARROS et al, 2018), além de flavonoides (DE LIMA et al, 2018) e óleo essencial contendo terpenos, sesquiterpenos e esteroides (WANG; QIWEN; LI; ZHANG; HUAYANG, 2016). A droga vegetal é utilizada como eupéptica, colerética e diurética e o extrato hidroalcoólico seco de boldo-do-chile parece exercer um efeito hepatoprotetor (FETROW; AVILA, 2000).

Em relação à Boldina, diferentes estudos apontam potencial antioxidante, neste sentido (O'BRIEN et al, 2006) MARTINEZ e colaboradores (1992) descreveram que este alcaloide inibe a peroxidação lipídica induzida em membranas microsomais de fígado de ratos. Subsequentemente, os autores relataram que este alcaloide também protege a desoxirribose contra a degradação induzida por  $Fe^{3+}$  na presença de peróxido de hidrogênio, presumidamente agindo como sequestrador de radicais hidroxil ( $HO\cdot$ ). Além disso, estudos recentes demonstraram que a Boldina tem atividade anti-inflamatória (NOURENI et al, 2018), hepatoprotetora, anti-tripanosoma, atividade citotóxica (PANDURANGAN et al, 2016) e diminuiu a inflamação colônica decorrente da colite em camundongos (GERHARDT et al, 2009). Ademais, o potencial gastroprotetor da Boldina tem sido estudado por nosso grupo de pesquisa, evidenciando o potencial antiúlcera deste composto na dose de 100 mg/kg em roedores. Em paralelo aos estudos sobre gastroproteção, esta pesquisa foi desenvolvida para investigar o potencial cicatrizante gástrico da Boldina em úlceras já instaladas, o qual ainda não havia sido estudado.

A úlcera gástrica é uma doença crônica que afeta milhões de pessoas no mundo, podendo evoluir para câncer gástrico e considerada um problema de saúde global (SUNG et al, 2007). Esta patologia é resultado de um desequilíbrio entre agentes protetores (barreira de muco, secreção de muco, regeneração celular, produção de prostaglandinas) e agentes agressores (secreção de ácido e pepsina) da mucosa gástrica (TOLEDO DIAS et al, 2009),

as opções de tratamento incluem fármacos antiácidos e principalmente, os antagonistas de receptores de histamina tipo 2 e inibidores da bomba de prótons (DONATINI et al., 2009). Contudo, apesar de efetiva, a terapia anti-secretora está associada a efeitos adversos e a uma pobre cicatrização da lesão com consequente recidiva da úlcera após interrupção da terapia farmacológica.

Neste contexto, dado o potencial antioxidante da Boldina, o envolvimento do estresse oxidativo no estabelecimento das lesões gástricas, bem como a lacuna existente em relação à atividade antiúlcera da molécula estudada e o potencial das plantas medicinais como fonte terapêutica, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o efeito cicatrizante do alcaloide Boldina em úlceras gástricas crônicas induzidas por ácido acético em ratos.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar o potencial cicatrizante gástrico da Boldina em modelo experimental de úlcera crônica em ratos

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar macroscopicamente e microscopicamente os efeitos da administração oral de Boldina na área da úlcera gástrica crônica induzida por ácido acético em ratos;
- Quantificar os efeitos do alcaloide Boldina nos níveis de mucina aderida à mucosa gástrica;
- Verificar o envolvimento das defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas na cicatrização gástrica promovida pela Boldina;
- Verificar os efeitos da Boldina na secreção ácida gástrica de ratos;
- Mensurar o efeito da incubação de Boldina na atividade da enzima pepsina *in vitro*





## 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 3.1 Plantas medicinais

De acordo com Tribess e colaboradores (2015), estima-se que cerca de 80% da população mundial utilizam plantas para tratamento de várias doenças. Em relação ao Brasil, essa utilização pode estar relacionada com a intensa biodiversidade no território nacional. De fato, dados estatísticos segundo estimativas da Convenção da Diversidade Biológica (CDB) indicam que o Brasil mantém entre 15 e 20% de toda a biodiversidade mundial, sendo considerado o maior do planeta em número de espécies endêmicas. Há ainda dados que indicam que existam 55 mil espécies de plantas (BARREIRO; BOLZANI, 2009).

Outros dados importantes que pode ser destacado é que, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 65-80% da população mundial que vive nos países em desenvolvimento depende essencialmente de plantas para cuidados de saúde primários (WHO, 1993). Portanto, nesse cenário pode-se concluir que o uso popular de plantas medicinais é um hábito que acompanha o ser humano desde os primórdios da civilização, sendo fundamentada no acúmulo de informações repassadas oralmente através de sucessivas gerações. Assim, ao longo dos séculos, os produtos de origem vegetal constituíram a base para tratamento de diferentes doenças no mundo (PHILLIPS & GENTRY, 1993a).

De forma interessante, além do conhecimento etnofarmacológico acumulado, as plantas medicinais são fonte de novas substâncias ativas e novas drogas de interesse farmacêutico (LEITÃO et al, 2014). De acordo com Calixto (2019) muitos exemplos de extratos derivados de plantas e / ou compostos isolados de plantas têm sido amplamente utilizados no tratamento de diversas doenças. Para citar apenas dois exemplos, o alcaloide morfina isolado de *Papaver somniferum* e preparações ou compostos obtidos de maconha (*Cannabis sativa*) tem sido usado por mais de 4.000 anos.

No que tange o tratamentos de distúrbios gastrointestinais, incluindo gastrites e úlceras gástricas, também tem sido bastante comum a utilização de plantas medicinais em todo o mundo (SCHMEDA-HIRSCHMANN; YESILADA, 2005). Dentre as espécies mais utilizadas para esses fins, é válido ressaltar a *Maytenus ilicifolia*, a qual é utilizada sob a forma de preparações fitoterápicas. De fato, a eficácia pré-clínica desta espécie têm sido confirmada, por exemplo, a administração oral e intraperi-toneal de um extrato obtido das folhas de *M. ilicifolia* inibiu o aparecimento de lesões gástricas induzidas por indometacina (DUTRA et al, 2016).

### 3.2 *Peumus boldus* Molina

A espécie *Peumus boldus* Molina pertence à família Monimiaceae, tem como nome popular boldo ou boldo-do-Chile (MELO et al, 2004). O nome "boldo" é presumivelmente derivado do verbo indígena "weltum" (brotar de novo) ou "volitum" (para lançar novas raízes) (O'BRIEN et al, 2006). Essa espécie vegetal tem sido usada na América do Sul no tratamento de doenças do fígado e da vesícula biliar, sendo reconhecida como planta medicinal em várias farmacopeias (DE ALMEIDA, MELO, XAVIER, 2000). Entre os efeitos biológicos já descritos na literatura estão hepatoproteção, citoproteção, atividade antipirética e efeitos anti-inflamatórios. Além disso, no sistema cardiovascular, sua potente ação antioxidante sequestrante do óxido nítrico por espécies reativas de oxigênio, consequentemente protegendo o endotélio vascular (NOUREINI, S et al, 2018).

Botanicamente, trata-se de um arbusto ou árvore pequena e dióica do boldo-do-Chile (HOFFMANN, 1981 apud SCHWANZ, 2006, p.13). As citações na literatura sobre a altura que a espécie alcança são divergentes, podendo chegar a ter até 2 metros de altura (GUPTA, 1995 apud SCHWANZ, 2006, p.13); ou obtendo também de 5 a 6 metros (ALONSO, 1998; PDR, 2000 apud SCHWANZ, 2006, p.13), ou podendo chegar a ter de 7 a 8 metros (BRUN, 1936 apud SCHWANZ, 2006, p.13), e segundo MARTÍN e DOLI (1998) seu crescimento arbóreo pode alcançar até 20 metros. A copa é arredondada e o tronco é curto. As flores são unissexuais, pistiladas e estaminadas, brancas a branco-amareladas, dispostas em inflorescências do tipo racemosa com 3 a 15 flores, terminais ou axilares. A antese ocorre no período do inverno (Figura 1). Os frutos são drupas carnosas e doces, ligeiramente amarelos, aromáticos de 4 a 8 mm de comprimento, com amadurecimento no verão e dispersão, principalmente ornitófila. Estes podem permanecer na planta até a temporada seguinte, com um invólucro seco de coloração negra (MARTÍN; DOLI, 1998).



Figura 1: Foto ilustrativa das partes áreas de *Peumus boldus* Molina

Fonte: <[https://pt.wikipedia.org/wiki/Peumus\\_boldus](https://pt.wikipedia.org/wiki/Peumus_boldus)>

Como revisado por Urzlia e Acufia (1983), estudos sobre os constituintes químicos do Boldo-do-Chile demonstram que as folhas contêm 1,2% de taninos e 2-3% de óleos essenciais (até 45% de ascaridol e 30% de cineol e pelo menos 22 outros constituintes identificados, principalmente terpenóides). De forma interessante, o óleo essencial de boldo já foi empregado por sua reconhecida propriedade anti-helmíntica, devido a presença de ascaridol (DE CASTRO et al, 2016). Os flavonóides (por exemplo, a quercetina) estão presentes, como de costume, e cinco glicosídeos de flavonóis foram identificados: peosídeo (ramnetina-3-arabinosídeo-3'-ramnosídeo), boldosídeo (isoramnetina 3-glicosídeo-7-ramnosídeo), fragrosídeo (um diramósido de isoramnetina), kaempferol-3-glucósido-7-rhamnoside e isoramnetin-3-arabinoside-7-rhamnoside (SCHMEDA-HIRSCHMANN et al, 2003).

Alcalóides foram reconhecidos precocemente como componentes ativos no boldo-do-Chile, entre eles, a Boldina, a qual foi o primeiro a ser isolado há mais de 150 anos atrás (SPEISKY; CASSELST, 1994). Assim, o teor de alcaloides em folhas secas desta espécie vegetal encontra-se na faixa de 0,25-0,54% ou 0,4-0,5%, dos quais aproximadamente 12-19% é Boldina (SPEISKY; CASSELST, 1994). A maioria dos estudos realizou a quantificação de alcalóides em extrato alcoólico (metanol ou etanol) ou hidroalcoólico, obtido por maceração das folhas secas (PIETTA ET AL., 1988; SPEISKY & CASSELS, 1994; O'BRIEN ET AL., 2006).

As folhas apresentam ainda taninos, óleo essencial, flavonóides e glicolipídios (MENDES et al., 2006).

### 3.3 Boldina

A natureza oferece uma fonte inesgotável de novas estruturas químicas a serem descobertas e, como consequência, uma grande possibilidade para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para o tratamento de doenças que ainda não apresentam cura ou tratamento adequado, o que justifica o grande interesse da indústria farmacêutica por plantas medicinais. Cerca de um terço dos medicamentos mais prescritos e vendidos no mundo foram desenvolvidos a partir de produtos naturais, e foi graças aos produtos naturais que muitos fenômenos complexos envolvendo estruturas biológicas como enzimas, receptores, canais iônicos e outros e foram compreendidos (CALIXTO, 2003).

Assim os compostos bioativos presentes nas plantas despertam grande interesse devido aos seus benefícios a saúde humana no tratamento, prevenção e/ou cura de diversas doenças, incluindo a úlcera gástrica (AHMAD e KUMAR, 2013).

Entre as diversas estruturas que a natureza nos fornece esta a Boldina (1,10-dimetoxi-2,9-di-hidroxi aporfina) (Figura 2) a qual possui dois grupos adjacentes de porções metoxi, características comumente encontradas em compostos exibindo alta atividade antioxidante (SPEISKY, CASSELS, LISSI, VIDELA, 1991). A Boldina é um alcalóide aporfinóide, encontrado em várias espécies de plantas e é o principal alcalóide da casca e um componente relativamente abundante das folhas do boldo (*Peumus boldus*) e *Lindera aggregata* (NOUREINI et al, 2018).

O alcalóide aporfinóide existe amplamente na natureza e é um dos componentes característicos das espécies de *Lindera*. Mais de 600 alcaloides aporfinóides foram isolados de 19 famílias de plantas (GUINAUDEAU, 1994) e muitas dessas plantas foram usadas como medicamentos populares em diferentes partes do mundo para o tratamento de vários tipos de doenças.

Sobre sua solubilidade em água, Speisky et al (1991) estudaram que a Boldina, como a maioria dos alcalóides, é bastante lipofílico e insolúvel em água, porém seus sais são solúveis em água, incluindo o cloridrato.

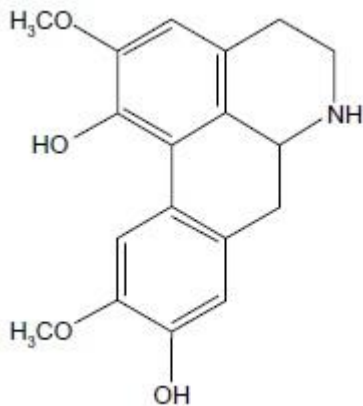


Figura 2: Estrutura química da Boldina  
(PAYDAR et al, 2014).

### 3.4 Efeitos Farmacológicos da Boldina

O potencial bioativo da Boldina tem sido descrito nas últimas décadas, incluindo atividade anti-inflamatória, antipirética, antidiabética, antiaterogênico, antiplaquetário (O'BRIEN et al, 2006), e citoprotetora (LAU et al, 2012). Adicionalmente, em termos gerais, a sua ação hepatoprotetora tem sido atribuída à prevenção da peroxidação lipídica nos microsomas hepáticos humanos e por eliminação de radicais hidroxila (PANDURANGAN et al., 2016). Ademais, também já foi descrito que a Boldina possui efeitos antioxidantes evitando a lise de eritrócitos, o que foi demonstrado por JIMENEZ e colaboradores (2000), os quais destacam propriedade citoprotetora tempo dependente frente ao dano hemolítico induzido quimicamente.

De fato, estudos a cerca da sua atividade antioxidante são frequentes, assim é possível sugerir que a Boldina poderia ser utilizada como produto nutracêutico com potencial para ser um protetor celular contra danos oxidativos (GÓMEZ; VELARDE, 2018).

Além de seu efeito antioxidante, o alcaloide Boldina tem demonstrado potencial terapêutico em relação ao diabetes. Neste interim, Salinas et al (2013) confirmaram que a mesma reduz os níveis de glicose no sangue de ratos em paralelo e diminui o estresse oxidativo renal, demonstrando que tem o efeito protetor da boldina no parênquima renal.

A cisplatina (cis-diaminodicloroplatina) é um dos medicamentos antitumorais mais eficazes para a quimioterapia do câncer. No entanto, estudos clínicos e experimentais relatam que a administração de cisplatina provoca dano tecidual no fígado, com aumentos

de radicais livres, bem como alteração do nível antioxidante enzimático e os mecanismos associados ao aumento da lipoperoxidação. A Boldina diminuiu essa lipoperoxidação no tecido hepático do rato tratado com Cisplatina em comparação ao que não havia sido tratado (FERNÁNDEZ et al, 2009).

Além de prevenir efeitos colaterais de quimioterápicos, alguns estudos relatam o potencial antitumoral da Boldina. Neste contexto, Jiménez et al (2000) estudaram vários alcalóides do tipo aporfinóide, e descreveram atividades citotóxicas e antitumorais, mostrando assim o grande potencial deste tipo de alcalóide no desenvolvimento de agentes anti-câncer (JIMÉNEZ et al, 2000).

Ainda no assunto de que Boldina pode ser um agente anti-cancerogênico, acordo com estudos de Noureini e Tanavar (2015), vários dos alcalóides de aporfina são conhecidos como inibidores da topoisomerase I ou II, diminuindo assim a probabilidade de aumento na proliferação de células cancerígenas.

A Boldina exibiu um efeito citotóxico e induziu apoptose em células do câncer de mama, como indicado pelo aumento na liberação de lactato desidrogenase (LDH), permeabilidade da membrana e fragmentação do DNA, e também foi descoberto que induz a parada do ciclo celular (PAYDAR et al., 2014). Esses achados sugerem que a mesma pode ser potencialmente usada no tratamento do câncer de mama. A Boldina também mostrou ainda atividade citotóxica em tumores de epitélio da laringe em células do tipo Hep-2 (CUSTÓDIO e JUNIOR, 2014).

Como citado anteriormente a Boldina tem propriedade que parece estar relacionada com atividade antiproliferativa e antitumoral, uma vez que ERRO'S estão envolvidas na promoção da proliferação de células neoplásicas (SLAGA, 1995; AMBROSONE, 2000; MARTÍN ET AL., 2007).

Estudos de Chen et al , 1996 demonstram que a Boldina possui efeito antiagregante plaquetário, sendo, que a trombose desempenha um papel especialmente importante nas causas de acidente vascular cerebral e doenças cardiovasculares, seja provavelmente um resultado da inibição da forma de tromboxano A2 (TENG et al, 1997).

Em relação aos efeitos em musculatura lisa, há um relato que a administração de Boldina foi capaz de inibir as contrações peristálticas intestinais de um gato anestesiado e exposto à administração subcutânea de carbacol (DELOURME, 1949). Ademais, a Boldina pode estar atrelada a um efeito relaxante muscular suave no íleo de rato que é parcialmente mediada por ações anticolinérgicas (SPEISKY et al, 1991). Em contrapartida tem sido relatado que a Boldina parece não ter atividade alfa-adrenérgica direta no ducto deferente de rato (DE LA HERAS et al, 1990). Porém, um estudo mostrou que este alcalóide se comporta como bloqueador  $\alpha$ -adrenérgico cardiovascular antagonista de cálcio no rato (SPEISKY; CASSELST, 1994).

Ainda no trato gastrointestinal, Pandurangan e Colaboradores (2016) descreveram o efeito protetor do alcaloide Boldina em modelo de colite ulcerativa induzida em camundongos por ingestão de dextran sulfato de sódio.

Em termos de segurança, a Boldina possui uma baixa toxicidade de acordo com estudos demonstrados por Speisky e Cassels (1994), foram necessários 15 g de Boldina, administrados por via oral, para induzir o óbito de um cão de 12 kg, da mesma forma que foi preciso 500 e 1000 mg/Kg para induzir letalidade em camundongos e porcos da Índia, respectivamente.

Estudos de toxicidade foram realizados por Dhingra e Soni (2018) com a Boldina, cuja DL<sub>50</sub> estimada foi maior que 800 mg/kg, v.o onde obtiveram baixa toxicidade fetal juntamente com poucos casos de atividade abortiva.

Ainda em relação ao seu efeito toxicológico, o extrato hidroetanólico das folhas de *P. boldus* e a Boldina (800 mg/kg, v.o., dose única) foram testados em ratos prenhes. Os autores encontraram efeitos teratogênicos e abortivos em ambos os grupos tratados ALMEIDA ET AL (2000). Nesse mesmo estudo, ratos machos tratados por via oral, durante 90 dias, com extrato bruto do boldo e com Boldina apresentaram aumento significativos no níveis séricos de transaminases e de colesterol e uma redução nos níveis de glicose, ureia e bilirrubina total, a partir do trigésimo dia de ingestão do extrato do boldo.

A Boldina foi testada em humanos para verificar seu potencial de toxicidade, houve um relato da ocorrência de um caso de dermatite alérgica ocupacional por boldo em um farmacêutico, entre os 33 casos por eles registrados no período de 1978 a 2001 (GIELEN; GOOSSENS, 2001). Já Monzón et al (2004) descreveram o caso de reação anafilática em um homem de 30 anos, com histórico de alergia ao pólen que consequentemente causava rinoconjuntivite, após a ingestão do chá de boldo. Quando o paciente já havia se recuperado totalmente, os médicos administraram o chá de boldo (250 mL, v.o.) e, meia hora depois, ele voltou a apresentar prurido na faringe, prontamente revertidos com administração de adrenalina subcutânea.

Quanto a suas interações medicamentosas os autores descreveram, em um artigo de revisão, o caso de um paciente em tratamento com varfarina, que após o consumo de boldo, apresentou um aumento do efeito anticoagulante. A interação boldo/varfarina foi confirmada, pois a ação anticoagulante do varfarina voltou aos níveis normais com a interrupção da ingestão de boldo e foi intensificada com a readministração de boldo ao paciente (IZZO et al, 2005).

Em um estudo realizado por Gerhardt et al (2009), onde foram realizados esfregaços sanguíneos manuais para mensuração de glóbulos brancos foram encontrados uma população maior de neutrófilos no grupo tratado com Boldina. Outro estudo sugeriu que a Boldina apresenta propriedades imunomoduladoras em células natural killer (GONZÁLEZ-CABELLO et al, 1994).

Alem desses efeitos farmacologicos já citados, também foi descrito que a Boldina diminuiu a disfunção endotelial da hipertensão em ratos do tipo SHR (ratos com hipertensão espontânea). Isso se deve ao fato de que o sequestro de NO derivado do endotélio pelo aumento do ânion superóxido, levando a concentrações inadequadas de NO e ao aumento da formação de peroxinitrito, pode contribuir para a diminuição papel do NO na regulação da pressão arterial na hipertensão (LAU et al, 2012).

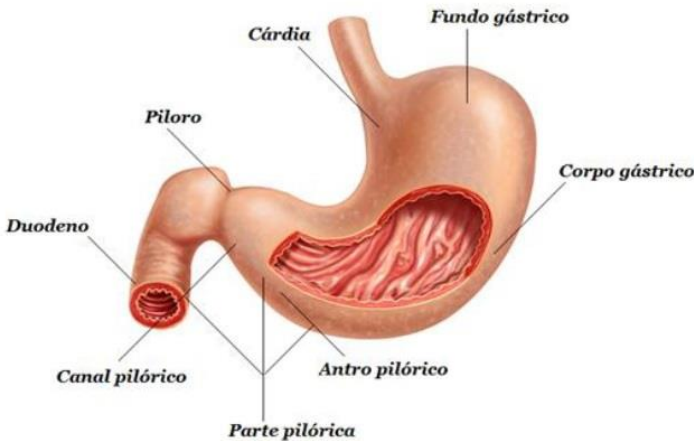


### 3.5 Aspectos anatômicos e histológicos do estômago

O estômago é dividido em quatro regiões anatômicas principais: a cárdia, o fundo, o corpo e o antro (SCHUBERT; PEURA, 2008). A cárdia e o antro são revestidos principalmente por células faveolares secretoras de mucina que formam pequenas glândulas. As glândulas antrais são similares, mas também contém células endócrinas, tais como as células G, que liberam gastrina para estimular a secreção luminal de ácido pelas células parietais dentro do fundo e do corpo gástricos. As glândulas bem desenvolvidas do corpo e do fundo também contém células principais (Figura 3) (KUMAR et al, 2010).

As funções motoras do estômago incluem a: (1) armazenar grandes quantidades de alimento até que ele possa ser processado no estômago, no duodeno e demais partes do intestino delgado; (2) misturar esses alimentos com secreções gástricas até formar uma mistura semilíquida denominada quimo; e (3) esvaziar lentamente o quimo do estômago para o intestino delgado, a uma vazão compatível com a digestão e a absorção adequada pelo intestino delgado (GUYTON; HALL, 2011).

Figura 3: Principais partes anatômicas do Estômago



Fonte: Modificado de: <<http://obatpenurunasamlambung.tipssehatonline.web.id/diagnosis-dan-pengobatan-tukak-lambung/>>

Apesar dos aspectos anatômicos diferenciados do estômago, sua histologia consiste em mucosa, submucosa, muscular externa e serosa (ROSS; PAWLINA, 2012). A mucosa gástrica é composta em um epitélio do tipo colunar e as glândulas gástricas, estes últimos são formados por tipos celulares com diferentes funções secretoras, dependendo da região gástrica em que estão localizados (DI STEFANO; MICELI; CORAZZA, 2010). Abaixo do epitélio, a região é constituída por tecido conjuntivo frouxo, denominado lamina

própria, que circunda as glândulas gástricas (cárdia, fúndicas e pilóricas). Há predomínio de fibras reticulares e colágenas na lâmina própria, e as fibras elásticas são raras. Os componentes celulares da lâmina própria englobam fibroblastos, linfócitos, mastócitos, eosinófilos e alguns plasmócitos. A muscular da mucosa pode projetar cordões finos de células musculares para dentro da mucosa para facilitar a liberação das secreções das glândulas (KIERSZENBAUM et al, 2012).

Já a submucosa é constituída por tecido conjuntivo denso irregular com grande quantidade de fibras colágenas e elásticas. Observa-se grande número de arteríolas, plexos venosos e linfáticos e, também, os corpos celulares e as fibras nervosas do plexo submucoso de Meissner (KIERSZENBAUM et al, 2012). Ainda nesse contexto a muscular externa gástrica do estômago é composta de grupos de células ganglionares e feixes de fibras nervosas não mielinizadas. Coletivamente elas representam o plexo mioentérico (de Auerbach), que fornece inervação para as camadas musculares (ROSS; PAWLINA, 2012).

Por último temos a serosa gástrica, a qual a camada mais externa consiste de uma única fileira de células mesoteliais cubicas, sob as quais se encontra uma fina faixa de tecido conjuntivo frouxo. Uma zona subserosa de tecido conjuntivo situada entre esse revestimento mesotelial e a muscular externa também contém ramos ramificados de vasos sanguíneos, linfáticos e nervos (STERNBERG, 1997).

### 3.6 Fatores protetores da mucosa gástrica

O estômago secreta de 1 a 2 L de suco gástrico por dia, e entre os principais componentes presentes podemos destacar o ácido clorídrico (produzido pelas células parietais) e o pepsinogênio (produzido pelas células principais) que em pH ácido é convertido em pepsina (AIRES, 2008). Desta forma, o órgão é exposto a um microambiente extremamente agressivo e dispõe de fatores protetores para a manutenção da homeostasia tissular.

A mucosa gastroduodenal possui múltiplos mecanismos de defesa para se proteger de lesões causadas pelo estresse oxidativo, lesões induzidas por infecção por *H. pylori*, lesões isquêmicas e de reperfusão e lesões induzidas por drogas, principalmente devido a drogas anti-inflamatórias não esteroidais (AINES) (KEMMERLY; KAUNITZ, 2014) .

A barreira de fosfolípídios, de bicarbonato e de muco constitui a primeira linha de defesa da mucosa. O muco é secretado pelas células da superfície epitelial e contém 95% de água e 5% de mucina. Sendo estimulado pelos hormônios gastrintestinais, incluindo gastrina e secretina, bem como prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) e agentes colinérgicos (LAINE et al, 2008).

A camada de muco aderida à mucosa gástrica protege o epitélio contra o ácido, a pepsina e outros agentes necrotizantes, como o álcool e utilização prolongada de AINES, sendo importante também na recuperação da mucosa gástrica (BIGHETTI, ANTONIO,

CARVALHO, 2002). O bicarbonato é secretado pelas células estomacais e duodenais, em resposta a vários estímulos, como prostaglandinas (PG's), peptídeos gastrointestinais e contato com o ácido gástrico, permanecendo principalmente abaixo ou na camada mucosa (LEUNG, MILLER, GUTH, 1986).

Além disso, a presença de estresse oxidativo pode ser frequente na mucosa gástrica, sendo o óxido nítrico (NO) um fator protetor da mucosa muito vulnerável a essa condição. De acordo com Elliott et al (1995), o NO é sintetizado por uma reação enzimática entre o oxigênio molecular e a L-arginina. O NO desempenha um papel fundamental de sinalização nos sistemas cardiovascular e nervoso, além de atuar em defesas imunológicas. Em relação à mucosa gástrica, o NO desempenha papel bifásico na resposta ulcerogênica da mucosa gástrica (RIBBONS et al, 1995; TANAKA et al, 1999); sendo que baixa concentração de NO aumenta o fluxo sanguíneo o que colabora para a cicatrização das úlceras (HOU et al., 1999).

O estresse oxidativo pode ser evitado pela ação das defesas antioxidantes, este pode ser definido como um estado em que há aumento da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) em detrimento da atividade do sistema antioxidante enzimático ou não enzimático (CNUBBEN et al, 2001). As defesas antioxidantes tissulares são de extrema importância na manutenção da homeostasia da mucosa gástrica contra a formação de EROs em decorrência do estresse oxidativo que pode ocorrer na mucosa gástrica (HELLOU; ROSS; MOON, 2012).

As enzimas que fornecem a primeira linha de defesa contra o anion superóxido e peróxido de hidrogênio incluem a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPX) (CNUBBEN; RIETJENS; WORTELBOER; ZANDEN; BLADEREN, 2001). FERREIRA e MATSUBARA (1997) acrescenta que a SOD catalisa o radical superóxido em  $H_2O_2$  e  $O_2$ , na presença do próton  $H^+$ , já a catalase (CAT) é uma hemoproteína citoplasmática que acelera a redução do  $H_2O_2$  a  $H_2O$  e  $O_2$ . Por fim, a GPX, que catalisa a redução do  $H_2O_2$  e peróxidos orgânicos para seus correspondentes alcoóis às custas da conversão da glutatona reduzida (GSH) a sua forma oxidada (GSSG).

A segunda linha de defesa antioxidante é não enzimática, composta principalmente pela GSH, que pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula, protegendo-a contra a lesão resultante da exposição a agentes como íons ferro e participa da detoxificação de agentes químicos e da eliminação de produtos da lipoperoxidação (MEISTER; ANDERSON, 1983).

Apesar de termos as primeiras e segunda linha de defesa da mucosa gástrica, o processo de cicatrização das úlceras é complexo e envolve o preenchimento da lesão na mucosa com o tecido de granulação, bem como a proliferação celular na margem da úlcera (KAZUMORI; ISHIHARA; RUMI, 2004).

### 3.7 Fatores Agressores da mucosa gástrica

Como descrito anteriormente, a mucosa gástrica está em exposição a vários fatores agressivos como exógenos, incluindo o estresse, utilização prolongada de AINES, consumo de etanol, infecção pela bactéria *Helicobacter pylori*, isquemia da mucosa gástrica e vários irritantes endógenos, como ácido clorídrico, pepsina, e os sais biliares. Assim, mesmo que a etiologia da úlcera péptica não seja bem compreendida acredita-se existir um desequilíbrio entre os mecanismos citoprotetores, representados basicamente pela secreção de muco, bicarbonato, prostaglandinas, óxido nítrico e substâncias sulfidrilicas não proteicas (BIGHETTI; ANTONIO; CARVALHO, 2002).

A *H. pylori* é atualmente reconhecida como sendo a causa mais importante de úlcera péptica, bem como um fator de risco para o desenvolvimento de malignidades gástricas (LAINE; HOPKINS; GIRARDI, 1998). De acordo com KUSTER et al (2006) esta pode levar a uma variedade de distúrbios superiores gastrointestinais, como gastrite crônica, úlcera péptica e câncer gástrico.

Na úlcera causada pela *H. pylori* podemos destacar o fator de agressão como a isquemia, sua patogênese inclui o acúmulo de neutrófilos na mucosa gástrica e subsequente reperfusão (ROBERTSON; CLANCY; CADE, 2003). Segundo EDDLESTON (1998) esse acúmulo durante a isquemia pode ser fisiopatologicamente relacionado com danos na mucosa gástrica induzidas por EROS produzidos por neutrófilos.

O influxo de neutrófilos nos tecidos é uma série complexa de eventos que incluem contato com o endotélio, rolamento, adesão e, finalmente, migração para os tecidos circundantes (EDDLESTON, 1998). Além da isquemia causada pelas espécies reativas de oxigênio liberadas por neutrófilos temos também como fatores agressores da mucosa gástrica o uso prolongado de AINES. Os AINES causam danos no estômago, pois inibem a enzima COX-1 e conseqüentemente reduz a síntese de PGE<sub>2</sub>, que está envolvida na secreção de muco, liberação de bicarbonato e na regulação do fluxo sanguíneo da mucosa gástricas (VANE; BOTTING, 1999).

Um importante fator agressivo da mucosa gástrica é o álcool que segundo HIRUMA-LIMA (2012), causa uma redução na produção de muco e na secreção de bicarbonato, exercendo um efeito tóxico diretamente do epitélio, que induz a formação de lesões necróticas características, além do aparecimento de radicais livres e isquemia.

Em adição, o stress também promove a ulcerogênese gástrica através de uma patogênese multifatorial, incluindo hiper-secreção ácida, redução da proliferação epitelial e secreção alterada de muco e bicarbonato (HORSA; AYELE; AYALEW, 2019).

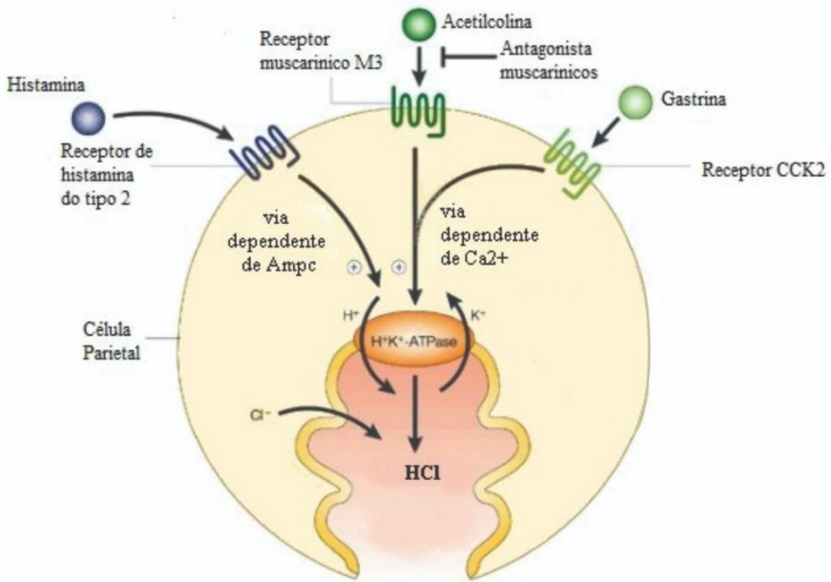
Em comum, o ácido gástrico, que também é um fator agressor endógeno, tem sua produção favorecida pelos agentes agressores da mucosa, criando um ambiente ácido que pode alterar a permeabilidade da célula e provoca ulceração (CRYER; MAHAFFEY, 2014). Além ambiente ácido gástrico, a pepsina promove dano gástrico caracterizada por

áreas focais de descontinuidade na camada do gel mucoso resultando na esfoliação da camada epitelial com um aumento dramático na permeabilidade da mucosa (ALLEN; FLEMSTRÖM, 2005).

### 3.8 Controle da secreção ácida gástrica

Os principais agentes que estimulam a secreção ácida incluem a gastrina (endócrina, secretada pelas células G), a acetilcolina (provém principalmente do controle pelo nervo vago, estimula as células parietais e as células que contem histamina) e a histamina (hormônio local) (Figura 4). A inibição da secreção é feita pela somatostatina (endócrina quando secretada por células D do antro e parácrina quando secretada por células D do corpo do estômago), por fatores de crescimento epidérmico (EGF) e por prostaglandinas estas últimas também estimulam as células superficiais a produzir muco e bicarbonato (AIRES, 2008).

Figura 4: Mecanismos de secreção do ácido gástrico



Fonte: Modificada de Olbe et al. (2003).

O ácido gástrico é secretado pelas células parietais do estômago em resposta a estímulos como a presença de alimentos no estômago ou no intestino. Tais estímulos resultam na ativação dos receptores do tipo 2 da histamina (receptores  $H_2$ ), muscarínico do tipo 3 (receptores  $M_3$ ) para acetilcolina ou receptores de colecistocinina do tipo 2 para gastrina (receptores  $CCK_2$ ) localizados na membrana basolateral da célula parietal, que inicia as vias de transdução de sinal que convergem na ativação da enzima  $H^+/K^+$  ATPase, conhecida como bomba de próton.

A secreção da histamina que vem das células ECL é criticamente importante no controle da secreção ácido gástrico. Nas células ECL a Histidina descarboxilase (HDC) converte L-histidina em histamina que é transportada e armazenada em vesículas secretoras (KAZUMORI; ISHIHARA; RUMI, 2004). A liberação da histamina, ativa o receptor  $H_2$ , estimula a atividade da adenilato ciclase (WOLLIN, CODE, DOUSA, 1976).

A acetilcolina libertada do nervo vago estimula secreção ácida gástrica através de um receptor muscarínico tipo  $M_3$  nas células parietais (MÖSSNER; CACA, 2005). Ela também estimula a secreção indiretamente de  $M_2$  e  $M_4$  nas células D acoplados a inibição da secreção da somatostatina, removendo assim a restrição exercida pelo peptídeo gastrina, ECL e células parietais (SCHUBERT; PEURA, 2008).

Assim como temos a acetilcolina que estimula a secreção ácida gástrica, temos a gastrina que esta presente principalmente nas células G do antro e também no duodeno, é sintetizado como um grande precursor de 101 aminoácidos. A estimulação ocorre quando a gastrina se liga aos receptores  $CCK_2$  nas células ECL, levando à secreção de histamina (HOU; SCHUBERT, 2006).

Foi demonstrado que os músculos circulares e longitudinais de todas as regiões do estômago contêm o aparelho enzimático necessário para converter AA em PGs. (ATAY, TARNAWSKI, DUBOIS, 2000). As prostaglandinas inibem a secreção ácida, aumento o fluxo sanguíneo e acelera a reconstituição epitelial e cicatrização da mucosa. Também inibe, a ativação de células e a aderência de leucócitos e plaquetas no endotélio vascular (LAINE et al., 2008). A função da  $PGE_2$  é decorrente de sua ligação com quatro receptores diferentes de prostanóides, denominados  $EP_1$ ,  $EP_2$ ,  $EP_3$ , e  $EP_4$ . Em adição as  $PGE_2$  e  $PGI_2$ , a superfície das células epiteliais conectadas por junções de oclusão também compõem a barreira epitelial de proteção à mucosa gástrica (ATAY et al, 2000).

O principal inibidor da secreção ácida gástrica é a somatostatina que é sintetizada por 92 aminoácidos (SCHUBERT; PEURA, 2008). No estômago, as células de somatostatina estão intimamente ligadas suas células-alvo (por exemplo, células parietais, ECL e gastrina) diretamente por processos citoplasmáticos ou indiretamente via a circulação local (SCHUBERT; PEURA, 2008).

### 3.9 Úlcera gástrica

Uma úlcera péptica é uma área de lesão na mucosa gástrica (úlcera gástrica) ou intestinal (úlcera duodenal), causada principalmente pela ação digestiva do suco gástrico. Em relação as úlceras gástricas, a área de lesões mais frequentes é a do piloro, mas também ocorrem com frequência ao longo da pequena curvatura na extremidade antral do estômago ou, mais raramente, na extremidade inferior do esôfago, para onde o suco gástrico frequentemente reflui (GUYTON E HALL, 2011).

De acordo com GUYTON e HALL (2011) a causa comum da úlcera é o desequilíbrio entre a taxa de secreção de suco gástrico e o grau de proteção dado pela barreira da mucosa gastroduodenal e pela neutralização do ácido gástrico pelos sucos duodenais, uma dessas causas é a infecção pela bactéria *H. pylori*.

A infecção por *H. pylori* é um fator preponderante na patogênese de úlcera gástrica. Está presente em praticamente em aproximadamente 70% dos pacientes com úlceras gástricas. Outros fatores como a utilização prolongada de AINEs (impedem a produção de prostaglandinas), o tabagismo (compromete o fluxo sanguíneo e cicatrização) e estresse psicológico também contribuem para a formação de úlceras (TARNAWSKI et al, 2013).

Nos dias atuais, dados epidemiológicos de úlceras pépticas e suas complicações têm demonstrado notáveis variações geográficas quanto à sua incidência e prevalência. Segundo Bernardo et al, 2017 somente nos Estados Unidos da América (EUA), existem cerca de 500 mil novos casos e 4 milhões de recorrências, apresentando prevalência de 8 a 14% na população em geral. Grande parte destas úlceras são tratadas com eficácia, embora outras evoluam a ponto de gerar uma complicação, podendo, inclusive, levar ao óbito.

Visto que os principais fatores que levam a formação de úlcera no trato gastrointestinal (TGI) envolvem o desequilíbrio entre os fatores que provocam dano na mucosa (como ácido e pepsina) e os agentes protetores (muco e bicarbonato), além da infecção por *H. pylori*, as estratégias de tratamento das úlceras visam corrigir ou atenuar este desequilíbrio. Contudo, as estratégias atuais são baseadas na supressão ou redução da acidez do conteúdo luminal gástrico, seja por ação de inibidores da bomba de prótons (IBP'S), como o omeprazol, lansoprazol, pantoprazol, antagonistas dos receptores H<sub>2</sub> da histamina, sendo assim, ranitidina e cimetidina ou ainda antiácidos como o hidróxido de magnésio, hidróxido de alumínio, bicarbonato de sódio entre outros (KANGWAN et al, 2014).

Os IBPs são usados como tratamento de primeira linha para esta doença, porém apesar da eficácia, o uso prolongado está associado a diferentes efeitos adversos como dores de cabeça, náuseas ou dores abdominais foram notificadas, bem como outros mais frequentes como aumento de infecções (pneumonia, diarreia, pode apresentar recorrência dentro de um ano após o término do tratamento aumento do risco de fratura óssea,

hipomagnesemia e hiperplasia das células tipo enterocromafins (ECL) (GRANERO-MELCON et al, 2018).

Além dos efeitos colaterais dos IBP'S temos também dos sais de magnésio, que causam diarreia, enquanto os sais alumínio tem a constipação (RANG, et al, 2004).

Já os efeitos indesejáveis dos antagonistas dos receptores de H<sub>2</sub> são diarreia, tonturas, dores musculares, alopecia, rashes transitórios e hipergastrinemia. A cimetidina, algumas vezes, causa ginecomastia em homens, e diminuição da função sexual, também inibe a citocromo P450 e pode retardar o metabolismo potencializando a ação de determinados fármacos como anticoagulantes orais e antidepressivos tricíclicos. Pode causar confusão em idosos (RANG et al, 2004).

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Obtenção da Boldina e escolha da dose**

O alcaloide Boldina foi obtido comercialmente com pureza maior que 95% da Sigma-Aldrich (Sta Louis, MO, EUA). A dose utilizada neste estudo foi a mínima dose efetiva em promover gastroproteção em estudos paralelos do nosso grupo de pesquisa (dados ainda não publicados).

### **4.2 Animais**

Foram utilizados ratos Wistar pesando entre 200– 300g, provenientes do Biotério Central da Universidade do Vale do Itajaí – UNIVALI. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno, colocados em sala climatizada (25 °C.), com período claro e escuro de 12 horas cada, controlado automaticamente, tendo livre acesso à ração e água. Oito horas anteriores aos experimentos, os animais foram mantidos em jejum, com livre acesso a água. Quanto às questões éticas, o projeto foi aprovado no Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Vale do Itajaí (068/17).

### **4.3 Modelo de úlcera induzida por ácido acético em ratos**



O modelo de úlcera crônica induzida por contato com ácido acético descrito por Tabagi, Okabe e colaboradores (1969) foi realizado com algumas modificações. Foram utilizados ratos submetidos a jejum de 8 horas e divididos em diferentes grupos (n=6), os quais receberam anestesia com Xilazina e Cetamina (10 mg/kg e 5 mg/kg, i.p., respectivamente), e foram submetidos a uma incisão longitudinal abaixo ao processo xifóide. Após isso, o estômago foi localizado e a camada serosa foi exposta e instilada com 500 µL de ácido acético 80% durante 1 minuto com auxílio de uma cânula de plástico. Após o ácido acético foi removido, a região foi lavada com solução salina, seca cuidadosamente com algodão e a parede abdominal foi suturada.

O tratamento dos animais iniciou no segundo dia após a cirurgia, administrando sempre após 30 min do recebimento da ração por via oral: o veículo (água/tween a 1%, controle negativo), omeprazol (Ome: 20 mg/kg; controle positivo) ou Boldina (100 mg/kg), duas vezes ao dia, durante sete dias. Ao final do período de tratamento, os animais foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub>, a área da ulcera foi localizada e retirada para mensuração da área da lesão, a qual foi expressa em mm<sup>2</sup>.

#### **4.4 Avaliação Histopatológica**

O sítio da lesão ulcerosa foi isolada e preservada, de acordo com KALLAYA e colaboradores (2006), em uma solução fixadora composta por álcool 80%, formaldeído 15% e ácido acético (5%). Após, as amostras foram cortadas em finas seções de 5 µm e coradas com hematoxilina e eosina. Mudanças histopatológicas e a extensão das lesões foram observadas em microscópio óptico sob aumento de 100 ×.

#### **4.5 Avaliação histoquímica do conteúdo de mucinas**

A coloração pelo método do ácido periódico de Schiff foi realizada de acordo com Mowry e Winkler (1957) e usada para verificar as alterações nos níveis de mucina contida na mucosa gástrica depois da indução da ulcera gástrica pelo ácido acético. Uma parte das seções teciduais preparadas para avaliação histológica foi destinada a esta metodologia, sendo então desparafinizadas, reidratadas, oxidadas com ácido 0,5% por 5 minutos e lavadas contínuas em água destilada. Depois disso, as seções foram coradas com reagente de Schiff por 20 min e posteriormente lavadas em água sulfurosa (3 vezes por 2 minutos) e em água corrente por 10 minutos. Finalmente as partes contendo seções foram coradas com hematoxilina por 20 segundos e desidratadas. As glicoproteínas coradas pelo reagente de Schiff em rosa foram quantificadas com o software ImageJ®, como descrito por (PEREIRA et al., 2013).

#### 4.6 Preparação da fração subcelular gástrica

Para as análises enzimáticas e não-enzimáticas, amostras do sítio da lesão gástrica de todos os animais foram coletadas e pesadas. As amostras foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio (200 mM, pH: 6,5), uma porção do homogenato resultante foi retirada para a realização da quantificação do conteúdo de glutatona reduzida (GSH). O homogenato restante foi submetido a centrifugação a 9000 rpm por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante resultante foi usado para a mensuração da atividade de catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutatona-S-transferase (GST). O precipitado foi utilizado para determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO).

#### 4.7 Quantificação dos níveis de GSH

Os níveis de GSH na mucosa gástrica foram quantificados como descritos por SEDLAK e LINDSAY (1968). Em tubos de polipropileno houve adição de 50 µL do homogenato de cada amostra preparado anteriormente e 40 µL de ácido tricloroacético 12%, os tubos foram agitados e centrifugados por 15 minutos a 4.000 rpm sob temperatura de 4 °C. Foram adicionados 10 µL do sobrenadante em placa de 96 poços, 290 µL de tampão TRIS 0,4M (pH 8,9) e 5 µL de solução metanólica de 3,96 mg/mL de 5,5'-ditiobis 2-ácido nitrobenzoico. A leitura da absorbância em 420 nm foi realizada 15 minutos após. Os valores individuais foram interpolados numa curva padrão de GSH (1 – 10 µg/mL) e expressos em µg de GSH/g tecido.

#### 4.8 Determinação da atividade da SOD e CAT

A determinação da atividade da SOD e CAT foi realizada como descrito por Marklund, Marklund, (1974) e Aebi(1984), respectivamente. Para determinação da atividade da SOD, em tubo de polipropileno foi adicionado 443 µL de Tampão Tris - EDTA e 20 µL de cada amostra. Após agitação, foi acrescentado 25 µL de pirogallol (1mM) e incubado. Depois de 20 minutos a absorbância foi mensurada a 420 nm. A quantidade de proteína que inibe a reação em 50% (IC<sub>50</sub>) equivale a 1 unidade (U) de SOD. Os resultados foram expressos em U de SOD/mg de proteína.

Para a determinação da atividade da CAT, 10 µL da amostra foram adicionados a 990 µL de solução reacional (peróxido de hidrogênio 30% diluído em tampão Tris/ EDTA 5mM - pH 8,0). A absorbância foi medida em 240 nm durante 1 minuto e os resultados foram expressos em mmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumido/mg de proteína/minuto.

#### 4.9 Quantificação da atividade da GST

A determinação da atividade da GST foi realizada com base no método de Habig e colaboradores (1974). A atividade específica da GST foi determinada pela conjugação do dicloro-nitro-benzeno (CDNB) com GSH, formando um tioéter que pode ser monitorado pelo aumento de absorbância. Assim, triplicatas de 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foram adicionados a 200  $\mu\text{L}$  de solução-reação contendo CDNB 3 mM (diluído em etanol 98%) e GSH 3 mM. A atividade da GST foi quantificada em intervalos de 10 s durante 1 min, em espectrofotômetro a 340 nm e expressa em nmols/mg de proteína/min.

#### 4.10 Determinação da atividade da MPO *in vivo*

A atividade da mieloperoxidase gástrica foi mensurada de acordo com o método descrito por Bradley et al. (1982) e modificada por De Young et al. (1989). Resumidamente, o precipitado do homogeneizado (preparado como descrito no item 5.5), foi misturado em tampão fosfato de potássio 80 mM (pH 5,4) contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio e centrifugado em 12000 rpm durante 20 minutos a 4°C). A atividade MPO foi determinada a 620 nm no sobrenadante na presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina e expressa como unidades de densidade óptica (m.O.D.)/mg de proteína.

#### 4.11 Ligadura do Píloro

Para a ligadura pilórica, os ratos foram anestesiados com xilazina e cetamina (10 e 5 mg/kg, i.p., respectivamente). Uma incisão de cerca de 2 cm foi realizada no abdômen, o estômago foi localizado e realizada a ligadura do esfíncter pilórico com auxílio de um fio de sutura, a parede abdominal foi suturada após esse procedimento. Transcorrido 4 h da cirurgia, os animais foram eutanasiados e seus estômagos foram removidos após pinçamento do esôfago para evitar perda do conteúdo ácido secretado. O estômago foi lavado com água, seco com uma gaze e aberto ao longo da curvatura menor. A mucosa foi lavada com 3 mL de água destilada, recolhendo-se o suco gástrico e o conteúdo proveniente da lavagem da mucosa em tubos de ensaio para a centrifugação (1.500 rpm, durante 20 min). Após a centrifugação, o volume gástrico (mL) foi quantificado em proveta e a acidez total (mEq[H<sup>+</sup>]/mL) foi quantificada por titulação simples com hidróxido de sódio 0,1 N, utilizando fenolftaleína 2% como indicador ácido-base (DOMER, 1971).

#### 4.12 Quantificação da atividade péptica *in vivo*

Uma alíquota de 0,1 mL do suco gástrico foi obtida e em seguida colocada em um tubo cônico e incubada com 5 mL de albumina bovina (5 mg/mL em HCl 0,06N), em temperatura de 37°C por 10 minutos. Interrompeu-se a reação com 0,5 ml de ácido tricloroacético (ATC) 10%, em seguida os tubos foram centrifugados em uma velocidade de 4000 rpm por 20 minutos. Após isso, 1 ml foi retirado e alcalinizado com 5 mL de carbonato de sódio a 0,55 M. Ao meio reacional, foram adicionados 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu 1N, onde foram incubados novamente por 30 minutos em temperatura ambiente. Terminada a incubação retirou-se 0,3 mL do preparado a absorbância foi mensurada em um espectrofotômetro a 660 nm. A curva padrão foi feita com tirosina e os resultados expressos em tirosina/ mL/ 4horas (ANSON, 1938).

#### 4.13 Quantificação da atividade péptica *in vitro*

Um meio reacional com proporção de 10 U de pepsina ativa/ $\mu$ g de proteína foi preparado através da adição de 1,5 mL de pepsina (4000 U/mL) incubado ou não com 100  $\mu$ L de amostra (soluções de Boldina na concentração de 1 -100  $\mu$ g/mL). Após 5 minutos sob temperatura de 37°C, foi adicionado 80  $\mu$ L de albumina (5mg/mL preparada em HCl 0,06N) e a mistura foi incubada em 37°C durante 40 e 100 min como descrito por Thomas et al. (2004). A seguir, uma alíquota de 0,1 mL do meio reacional foi obtida e em seguida colocada em um tubo cônico e incubada com 0,5 ml de ácido tricloroacético (ATC) 10%, em seguida os tubos foram centrifugados em uma velocidade de 4000 rpm por 20 minutos. Após isso, 0,5 ml foi retirado e alcalinizado com 2,5 mL de carbonato de sódio a 0,55 M. Ao meio reacional, foram adicionados 0,25 mL do reagente de Folin-Ciocalteu 1N, onde foram incubados novamente por 30 minutos em temperatura ambiente. Terminada a incubação retirou-se 0,3 mL do preparado a absorbância foi mensurada em um espectrofotômetro a 660 nm. A curva padrão foi feita com tirosina e os resultados expressos em tirosina/ mL/ 4horas como descrito por ANSON (1938).

### 5.0 Análise Estatística

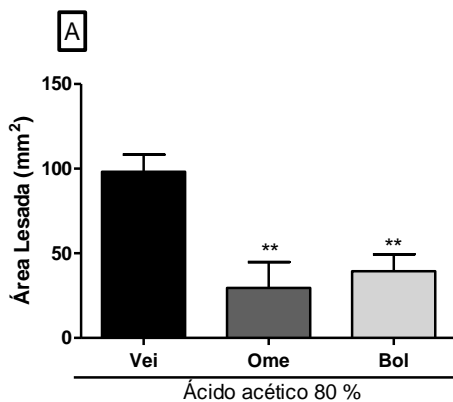
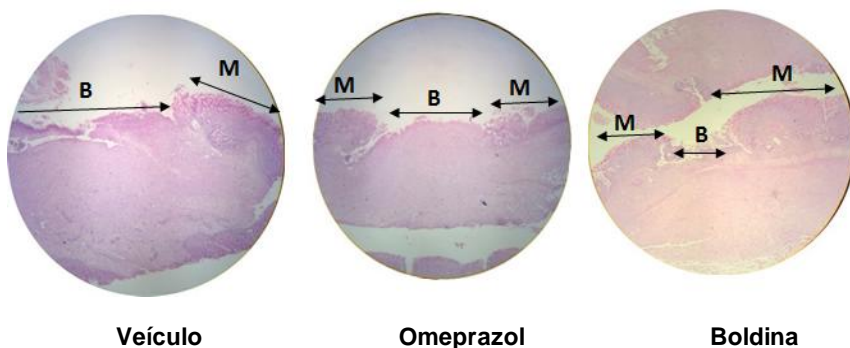
Os resultados obtidos foram apresentados como as médias  $\pm$  erro padrão das médias de n=6. Foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de uma via seguida por teste post hoc de Bonferroni. As análises foram realizadas usando o Programa para Windows, GraphPadPrism versão 5.0 (GraphPad Software, San Diego, EUA). Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

## **6. RESULTADOS**

### **6.1 Efeito da administração oral de Boldina sobre a área ulcerada**

Como demonstrado na figura 5, a instilação de ácido acético na serosa gástrica ulcerou a mucosa em uma extensão de  $98,20 \pm 10,11 \text{ mm}^2$  nos animais tratados apenas com veículo. Em contrapartida, a administração oral de Boldina (100 mg/kg) duas vezes ao dia durante sete dias foi capaz de reduzir a área em 59,88 %, quando comparado ao grupo ulcerado tratado com veículo. Como esperado, o tratamento com omeprazol (20 mg/kg, usado como controle positivo) duas vezes ao dia durante sete dias também reduziu a área ulcerada em

69,55%.

**B**

**Figura 5: Efeito da administração oral de Boldina sobre a área da ulcera induzida por ácido acético em ratos.** Os animais receberam veículo (Vei: água e tween 80 a 1%, 0,1 mL/kg), omeprazol (Ome: 20 mg/kg) ou Boldina (100 mg/kg) duas vezes ao dia durante sete dias. Os resultados foram expressos como médias  $\pm$  E.P.M. (n = 6). ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni. \*\* $P < 0,01$  quando comparados ao grupo ulcerado tratado com veículo. Sendo B: Base e M: Margem.



**Figura 6: Efeito da administração oral de Boldina sobre os níveis de mucina no sítio da úlcera.** Os animais receberam veículo (Vei: água e tween 80 a 1%, 0,1 mL/ kg), omeprazol (Ome: 20 mg/kg) ou Boldina (100 mg/kg) duas vezes ao dia durante sete dias. Os resultados foram expressos como médias  $\pm$  E.P.M. (n = 6). ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni. \*\*P < 0,01 quando comparados ao grupo ulcerado tratado com veículo.

### **6.3 Efeito da administração oral da Boldina sobre os níveis de GSH no sítio da úlcera**

Como demonstrado na tabela 1, os níveis basais de GSH no grupo não-ulcerado (Naive) foram de  $149,7 \pm 18,7$   $\mu$ g de GSH/ g de tecido. Como esperado os níveis de GSH foram reduzidos para  $67,7 \pm 6,1$  no grupo ulcerado tratado com veículo. Em contrapartida, a administração oral de Boldina (100 mg/kg) duas vezes ao dia durante sete dias foi capaz de aumentar em 151% estes níveis, quando comparado ao grupo ulcerado tratado como veículo. Vale ressaltar que o conteúdo de GSH no grupo tratado com Boldina foi semelhante ao encontrado no grupo naive ( $p > 0,05$ ). O tratamento com omeprazol (20  $\mu$ g/mL, usado como controle positivo) duas vezes ao dia durante sete dias não evitou a depleção de GSH.

### **6.4: Efeito da Boldina sobre a atividade da enzima SOD no sítio da úlcera**

Como é possível verificar na tabela 1, os níveis da atividade da SOD foram aumentados em 54,5 % no grupo ulcerado tratado com veículo, quando comparado com o grupo não ulcerado (Naive:  $0,1102 \pm 0,0087$  U SOD/ mg de proteína). De forma não esperada o tratamento com omeprazol (20 mg/Kg, v.o) não foi capaz de reverter a diminuição da atividade da SOD nos tecidos ulcerados. Contudo, o tratamento com Boldina (100 mg/Kg, v.o) foi capaz de normalizar a atividade da SOD para níveis semelhantes aos encontrados no grupo naive ( $p > 0,05$ ).



### 6.5 Efeito da Boldina sobre a atividade da enzima CAT no sítio úlcerao

Como indicado na tabela 1, os níveis da atividade da CAT ficaram em média de  $11,324 \pm 1,426 \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína no grupo ulcerado tratado com veículo, representando um aumento de 63,6 % em relação ao grupo não ulcerado (Naive:  $4,296 \pm 0,546 \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína). De forma não esperada, o tratamento com Boldina (100 mg/Kg, v.o) ou omeprazol (20 mg/Kg, v.o) não foi capaz de reduzir a níveis basais a atividade da CAT, alcançando valores de  $16,383 \pm 4,431$  e  $10,446 \pm 2,973$  respectivamente.

### 6.6 Efeito da Boldina sobre os níveis da atividade de GST no sítio da úlcera

O grupo ulcerado tratado com veículo apresentou atividade da GST em níveis semelhantes ao grupo não-ulcerado (Naive:  $611,47 \pm 105,78 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína, tabela 1). De forma interessante, o tratamento com Boldina (100 mg/kg, v.o) aumentou esses níveis em torno de 111%, quando comparado com o grupo ulcerado tratado com veículo ( $5437,5 \pm 121,95 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína, tabela 1). Porém o tratamento com omeprazol (20 mg/kg, v.o) não alterou a atividade da GST no tecido ulcerado (Tabela 1).

**Tabela 1: Efeito da Boldina em parâmetros de estresse oxidativo na mucosa gástrica ulcerada por ácido acético.**

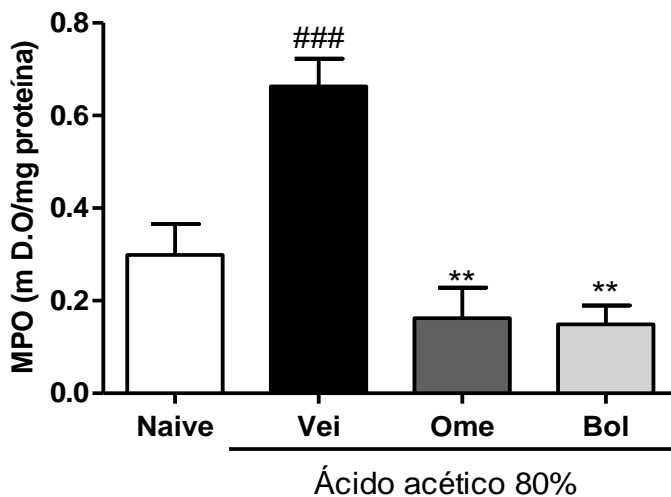
Grupos	GSH	SOD	CAT	GST
Naive	$149,7 \pm 18,7$	$1,1 \pm 0,8$	$4,29 \pm 0,5$	$611,4 \pm 105,7$
Veículo (1 mL/kg)	$67,8 \pm 6,1^{##}$	$1,7 \pm 0,1^{##}$	$11,32 \pm 1,4^{###}$	$543,7 \pm 121,9$
Omeprazol (20 mg/kg)	$67,3 \pm 16,0^{\#}$	$1,6 \pm 0,1$	$10,42 \pm 2,9^{##}$	$515,2 \pm 131,7$
Boldina (100 mg/kg)	$170,0 \pm 13,3^*$	$1,1 \pm 0,9$	$16,38 \pm 4,4^{##}$	$1147,6 \pm 502,0^{##}$ **

Glutathione reduzida (GSH,  $\mu\text{g}$  de GSH/g tecido), Superóxido dismutase (SOD, U/mg de proteína), Catalase (CAT, mmol de  $\text{H}_2\text{O}_2$  consumido/mg de proteína/minuto) e Glutathione-S-Transferase (GST, nmols/mg de proteína/min). Valores são expressos como média  $\pm$  erro padrão (n= 6). A comparação estatística foi realizada utilizando análise de variância

unidirecional (ANOVA) seguida do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. #  $p < 0,05$ ; ##  $p < 0,01$ ; ###  $p < 0,001$  vs. ao grupo não-ulcerado (Naive); \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$  vs. grupo ulcerado tratado com veículo

### 6.7 Efeito da administração oral da Boldina sobre a atividade da MPO no tecido ulcerado

Como demonstrado na figura 7 os níveis da atividade da enzima de MPO foram de  $0,50 \pm 0,16$  no grupo ulcerado tratado com veículo, representando um aumento de 69,7 % em relação ao grupo não-ulcerado (Naive:  $0,29 \pm 0,07$  mD.O/ mg de proteína). O tratamento com Boldina (100 mg/kg, v.o) reduziu esses níveis em 70%. De forma semelhante, o tratamento com omeprazol (20 mg/kg, v.o) foi capaz de reduzir a atividade da MPO em 68% nos tecidos ulcerados.



**Figura 7: Atividade da administração oral da Boldina sobre a atividade de MPO no tecido ulcerado.** Os animais receberam veículo (Vei: água e tween 80 a 1%, 1 mL/ kg), omeprazol (Ome: 20 mg/kg) ou Boldina na dose de 100 mg/kg duas vezes ao dia durante sete dias. Os resultados foram expressos como médias  $\pm$  E.P.M. (n = 6). ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni. ###  $P < 0,01$  quando comparados ao grupo naive. \*\*  $P < 0,01$  quando comparados ao grupo tratado com veículo.

## 6.8 Efeito da administração intraduodenal de Boldina sobre a secreção ácida gástrica de ratos

Como demonstrado na tabela 2, o grupo veículo apresentou um volume de  $4,1 \pm 0,5$  mL, valores de pH em média de  $3,3 \pm 0,3$  e acidez total de  $18,3 \pm 1,8$  mEq[H<sup>+</sup>]/mL. Como esperado, os animais tratados com omeprazol apresentaram redução de acidez total e aumento de pH, alcançando níveis de  $5,1 \pm 0,7$  e  $9,8 \pm 3,3$  mEq[H<sup>+</sup>]/mL, respectivamente. De forma diferente, o tratamento com Boldina não alterou os valores de pH ou acidez total do conteúdo secretado, quando comparado ao grupo veículo.

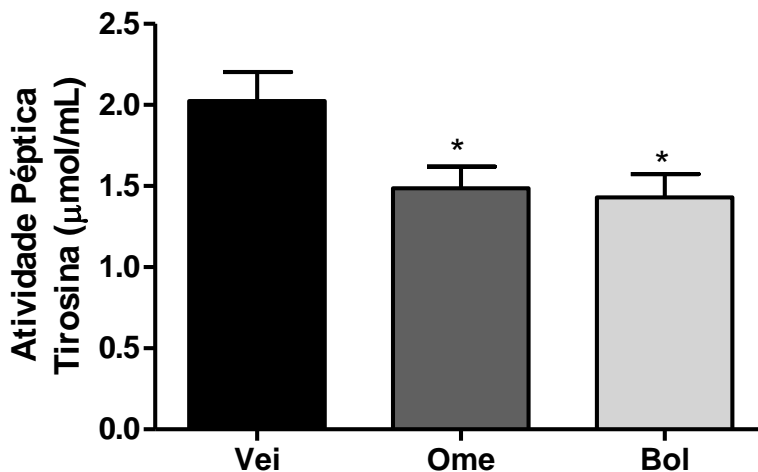
**Tabela 2: Efeito da administração intraduodenal de Boldina sobre a secreção gástrica de ratos**

<b>Grupos</b>	<b>Volume (mL)</b>	<b>Acidez total (mEq[H<sup>+</sup>]/mL)</b>	<b>pH</b>
<b>Veículo ( 1 ml/kg)</b>	$4,1 \pm 0,5$	$18,3 \pm 1,8$	$3,3 \pm 0,3$
<b>Omeprazol (20 mg/kg)</b>	$2,7 \pm 0,3^*$	$9,8 \pm 3,3^*$	$5,1 \pm 0,7^*$
<b>Boldina (100 mg/kg)</b>	$3,4 \pm 0,1$	$18,1 \pm 4,0$	$2,9 \pm 0,3$

Valores são expressos como média  $\pm$  erro padrão (n= 6). A comparação estatística foi realizada utilizando análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida do teste de comparações múltiplas de Dunnet. \*p < 0.05 vs. grupo tratado com veículo.

### 6.9 Efeito *in vivo* da administração de Boldina na atividade péptica

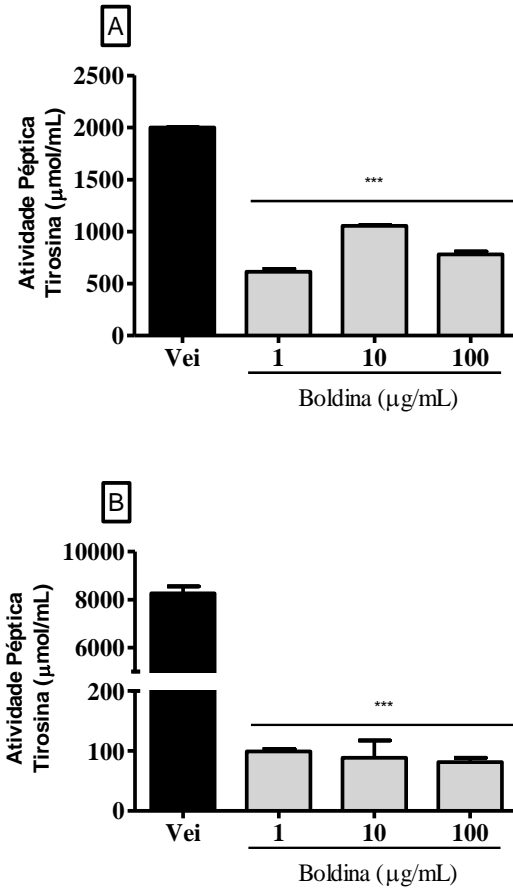
Neste estudo, a atividade péptica foi medida em  $\mu\text{M}$  de tirosina por 5 horas, e como é possível verificar na figura 8 foi observado no grupo controle valores de atividade péptica iguais a  $2,02 \pm 0,17 \mu\text{mol/mL}$  de tirosina, após o tratamento com Boldina foi obtido o valor de  $1,43 \pm 0,13 \mu\text{mol/mL}$  de tirosina e após o tratamento de omeprazol foi obtido o valor de atividade péptica  $1,48 \pm 0,14 \mu\text{mol/mL}$  de tirosina. Desta forma, foi possível observar redução de 29 e 27% nos valores de atividade péptica nos grupos tratado com Boldina e omeprazol, respectivamente, em relação ao grupo veículo.



**Figura 8: Efeito da administração de Boldina (100 mg/kg, i,d) na atividade péptica *in vivo*.** Os animais foram tratados com veículo (Vei, água, 1 ml/kg, id), Boldina (Bol, 100 mg/kg, id) ou omeprazol (Ome, 20 mg/kg, v.o) e submetidos à ligadura pilórica. Resultados são expressos em média  $\pm$  E.P.M. ANOVA de uma via seguida pelo teste de Dunnet. \* $p < 0,05$  vs. Grupo veículo.

## 7.0 Efeito *in vitro* da incubação de Boldina na atividade péptica

Assim, como observado na figura 9, foram avaliados os efeitos das concentrações de 1, 10 e 100  $\mu\text{g/mL}$  de Boldina na atividade da pepsina de forma *in vitro*. Como é possível observar na figura 9A, no tempo de 40 minutos o alcaloide inibiu totalmente a atividade da pepsina em todas as suas concentrações, entretanto na figura 9B, no tempo de 100 minutos, a incubação com Boldina nas concentrações de 1, 10 e 100  $\mu\text{g/mL}$  reduziram a atividade péptica em 69%, 47% e 61%, respectivamente, comparado ao grupo veículo ( $2.000,0 \pm 3,6 \mu\text{mol/mL}$  de tirosina).



**Figura 9: Efeito da administração da Boldina na atividade péptica *in vitro*.** Pepsina (4000 U/mL) foi incubada com veículo (Branco, água), Boldina (1-100 µg/mL) durante 40 (A) ou 100 minutos (B). Resultados são expressos em média ± E.P.M. ANOVA de uma via seguida pelo teste de Dunnet. \*\*\* $p < 0,001$  vs. veículo (Vei).

## 8 DISCUSSÃO

O alcaloide Boldina tem sido amplamente estudado como um potente antioxidante de origem natural além de possuir outras atividades farmacológicas interessantes, assim destaca-se a descrita atividade antiinflamatória, antitumoral, antidiabética e citoprotetora deste composto (JANG et al., 2000; OBRIEN, CARRASCO, SPEISKY, 2006; ZAHO, ZAHO WANG; 2006). Entretanto, os efeitos antiúlceras deste alcaloide ainda não haviam sido investigados, o que encorajou nosso grupo de pesquisa em estudar a hipótese sobre o potencial gastroprotetor e cicatrizante gástrico da Boldina em modelos pré-clínicos de úlcera gástrica aguda e crônica, respectivamente.

Primeiramente os efeitos gastroprotetores foram estudados, evidenciando o potencial protetor da Boldina contra os efeitos ulcerogênicos do etanol e da indometacina através da participação de grupamentos sulfidrila que possuem capacidade antioxidante, mas não da disponibilidade de óxido nítrico ou da inibição da atividade da enzima  $H^+$ ,  $K^+$ -ATPase (TOLENTINO, 2017). Em continuidade, o modo de ação pelo qual a Boldina promove gastroproteção foi investigado por Dos Santos e Vargas (2018), descrevendo o favorecimento de mecanismos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos no efeito protetor da mucosa gástrica elicitado por este composto.

Diante de tais achados, este estudo contribui na continuidade da investigação pré-clínica do potencial antiúlceras da Boldina. Contudo, dado que os trabalhos anteriores realizaram uma abordagem preventiva ou protetora desse alcaloide contra potenciais eventos ulcerogênicos, esta pesquisa foi desenhada e desenvolvida para mensurar os efeitos da administração oral de Boldina na cicatrização de úlceras gástricas crônicas, ou seja, adotando uma abordagem terapêutica.

O método utilizado com ácido acético em 80% possuem semelhanças com relação a úlcera humana no que diz respeito a cronicidade, localização e severidade, assim como o processo de cicatrização são parecidos (TAKAGI et al, 1969). De acordo com resultados obtidos neste estudo, a extensão da lesão induzida por ácido acético foi reduzida pela administração oral de Boldina (100 mg/kg), confirmando a capacidade deste composto

em acelerar o processo de cicatrização gástrica. Como esperado, o omeprazol também foi capaz de reduzir a extensão das lesões gástricas. Ademais, os resultados foram confirmados pela análise histológica das lesões gástricas, onde ficou evidente a redução da base da úlcera e o aumento da extensão da margem nos grupos tratados com Boldina ou omeprazol, evidenciando a regeneração da parede da mucosa gástrica.

Histologicamente a úlcera gástrica obtida pela exposição da mucosa ao ácido acético é composta de duas estruturas principais: a margem e a base da úlcera. A margem, também é chamada de zona de cicatrização, e a base da úlcera é formada por fibroblastos, macrófagos, células linfóides e células endoteliais (TARNAWSKI, 2005). Em relação aos resultados encontrados, a Boldina diminuiu a área ulcerada, indicando que ocorre cicatrização das úlceras gástricas já instaladas.

Considerando que o muco gástrico também é importante durante o processo de cicatrização gástrica por proteger as células da mucosa (DA SILVA, 2014), os níveis de mucina das úlceras crônicas também foram mensurados pelo método histoquímico de PAS. Como resultados dos experimentos pode-se observar que a Boldina aumentou o conteúdo de mucina na mucosa gástrica comparado com o grupo veículo, indicando que um importante efeito benéfico na proteção da mucosa gástrica por parte da Boldina. Inclusive, no tratamento da úlcera idiopática, esse aumento na produção de mucinas seria particularmente importante, no que tem sido relacionada com déficit especialmente de mucinas ligadas a membrana (NIV et al., 2014).

O processo inflamatório na ulcera gástrica envolve agentes quimiotáticos para o recrutamento e ativação de neutrófilos, o que consequentemente promove a liberação de ERO's e proteases, resultando em um dano tecidual inflamatório dependente de neutrófilos (FIALKOW et al., 2007). BRADLEY et al (1982) propuseram que a atividade da MPO, a qual esta presente em abundância nos neutrófilos, poderia ser considerada um marcador da infiltração neutrofílica durante a inflamação. De fato, em animais ulcerados tratados com veículo obteve-se um aumento nos níveis de atividade da MPO no sítio da ulceração por ácido acético, porém tanto a administração de Boldina como de Omeprazol reduziram a atividade desta enzima. Sendo assim é possível inferir que ambos os tratamentos reduziram a inflamação no local da lesão da úlcera. Os neutrófilos presentes no local da lesão da úlcera produzem o ânion superóxido ( $O_2^-$ ) e outras espécies reativas de oxigênio (KWIECIEN ET AL, 2002). O surgimento de radicais livres pode ser um fator crucial para a formação de lesões gástricas (HAMAISHI et al. 2006), pois estes compostos podem provocar danos celulares, podendo se associar com outras estruturas celulares como lipídios da membrana, proteínas e DNA (HELLOU et al, 2012). Sendo assim, a ativação e a infiltração de neutrófilos promove um desequilíbrio no balanço oxidativo e na microcirculação, contribuindo para o retardo da cicatrização gástrica (BOU-ABBOUD et al., 1998). Desta forma, o resultado obtido com níveis diminuídos de atividade da MPO no sítio da ulcera de animais tratados com Boldina também indica menor dano oxidativo, em especial mediado pela contribuição dos neutrófilos na inflamação tecidual. Além disso, os resultados

corroboram com estudos de PANDURANGAN et al (2016) onde a atividade da MPO também diminuiu em camundongos com colite comparados com o grupo veículo.

Na patogênese da úlcera há a presença de estresse oxidativo e sistemas antioxidantes para combate dos danos associados a tal condição. Entre as defesas antioxidantes, destacam-se as enzimas superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione S-transferase (GST), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione reductase (GR).

A SOD catalisa o ânion superóxido ( $O_2^-$ ) em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), que é futuramente degradado pela CAT ou GPx em água e  $O_2$  (KWIECIEN et al. 2002). De fato, a exposição da mucosa gástrica ao ácido acético aumentou a atividade da SOD e CAT, indicando uma necessidade tissular em combater EROs produzidas no sítio da lesão. Por outro lado, os dados obtidos em animais tratados com Boldina indicaram diminuição da atividade da SOD a níveis próximos aos animais não ulcerados. Contudo, animais tratados com Boldina ainda apresentaram atividade da CAT aumentada.

A regulação da expressão de CAT é feita nos níveis de transcrição, pós-transcrição e pós-tradução, que são regulados por receptores ativados pelo proliferador de peroxissoma (PPAR $\gamma$ ), consequentemente controlam a expressão do gene CAT. De acordo com YU et al (2009) o alcaloide Boldina interage na transdução de sinal através do PPAR modificando respostas inflamatórias. O aumento da atividade da enzima CAT pode estar envolvido no ativação de receptores PPAR pela Boldina.

No entanto, mais experimentos são necessários para confirmar essa hipótese.

De acordo com estudos realizados por Pandurangan et al (2016) onde citam que modelos de colite ocorre pouca diferença estatística com relação a enzima SOD, porém há um aumento na atividade da enzima CAT, houve semelhança entre esse estudo e os resultados encontrados.

O tripeptídeo endógeno GSH, é encontrado em altas concentrações na mucosa gástrica de ratos e humanos (BODY et al, 1979), compondo um importante mecanismo citoprotetor (CNUBBEN et al., 2001). O GSH atua diretamente como um antioxidante potente e de maneira indireta como substrato para várias outras enzimas antioxidantes, sendo elas: GST, GPx e GR (CNUBBEN et al., 2001). De fato, os resultados demonstraram que após a exposição ao ácido acético ocorre redução nos níveis de GSH na mucosa gástrica, pressupondo que a diminuição deste recurso antioxidante está associado à ulceração da mucosa. Confirmando o potencial antioxidante da Boldina, os níveis de GSH estava aumentado em animais ulcerados tratados com esse alcaloide, de forma similar aos animais não-ulcerados.

O GST é uma família multigênica de isoenzimas que catalisam a conjugação dos compostos eletrofílicos a GSH, produzindo compostos menos reativos. A GST participa da defesa contra o estresse oxidativo devido a capacidade desta enzima em detoxificar compostos endógenos que causam danos (CNUBBEN, 2001). Confirmando o potencial antioxidante da Boldina, o níveis de GST estavam aumentados em animais tratados com a Boldina comparados aos animais do grupo veiculo.



Durante décadas o tratamento para a doença ulcerosa objetivou a supressão da secreção ácida gástrica, no intuito de restabelecer o equilíbrio da mucosa gástrica. Sendo a classe dos inibidores da bomba de prótons representada pelo omeprazol, lansoprazol, rabeprazol, pantoprazol e esomeprazol a mais utilizada. Apesar desses fármacos serem conceituados como eficazes em minimizar a secreção ácida e, por conseguinte os sinais e sintomas associados a doença ulcerosa péptica (PALILEO; KAUNITZ, 2011), muitos efeitos adversos (DINIZ, 2016) têm sido descritos para esta classe, bem como a recidiva da lesão após interrupção do tratamento (TARNAWSKI, A et al., 1995).

O processo para diminuir o ácido no ambiente gástrico por estes fármacos ocorre através dos canalículos secretórios de ácido da célula parietal. Por esta ação ocorre a inativação da bomba de prótons via formação de ligações de dissulfeto entre a estrutura dos fármacos e a estrutura proteica da referida bomba. A sua forma ativa, sulfenamida cíclica ou ácido sulfênico reage por ligação covalente com o grupo sulfidril da cisteína 813 de domínio extracelular da bomba de prótons, que possibilita à inibição da secreção do ácido clorídrico. Recentemente, TOLENTINO (2017) demonstrou o efeito gastroprotetor do alcaloide Boldina e DOS SANTOS E VARGAS (2018) evidenciou a participação de mecanismos antioxidantes neste efeito. Ademais, de forma interessante o alcaloide não inibiu a atividade da bomba de próton em ensaio *in vitro*. Apesar do exposto, os efeitos *in vivo* da administração da Boldina na secreção ácida gástrica ainda não haviam sido elucidados, e uma vez que um resultado *in vitro* não reflete indubitavelmente um efeito em um sistema biológico e complexo *in vivo*, este estudo acessou os efeitos do alcaloide na secreção ácida gástrica de ratos. Neste estudo, o efeito anti-secretor ácido gástrico do alcaloide Boldina foi mensurado em ratos submetidas à ligadura pilórica. Como demonstrado nos resultados, a administração de Boldina não foi capaz de alterar os padrões mensurados no conteúdo secretado.

É sabido que antagonistas do receptor H<sub>2</sub> da histamina, como a ranitidina, e inibidores da bomba de prótons (incluindo o omeprazol) são utilizados para o controle da acidez gástrica e no tratamento de úlceras pépticas e da doença do refluxo gastroesofágico (DIAS et al., 2015). Como esperado, o tratamento com omeprazol reduziu a acidez do conteúdo gástrico, indicando a reprodutibilidade do experimento. Entretanto, a ausência de efeitos no grupo tratado com Boldina indica fortemente que apesar de gastroprotetora e de ser capaz de acelerar a cicatrização de úlceras gástricas, esse composto não exerce efeito antisecretor ácido gástrico.

A secreção das enzimas digestivas estomacais, principalmente a pepsina que é responsável pela quebra da maior parte do material proteico ingerido, é estimulada pela liberação do pepsinogênio no estômago, que é o precursor da pepsina. Tanto o pepsinogênio quanto outras enzimas digestivas são estimuladas principalmente pelos sinais do sistema autônomo do vaso vago, regulados pela acetilcolina (HOOGERWERF; PASRICHA, 2003). A pepsina é uma enzima expressa como um protótipo de zimogênio e pepsinogênio e é liberado pelas células principais no estômago para degradar proteínas alimentares em

peptídeos (WANG, et al., 2013). Em relação a pepsina, foi possível observar redução nos valores de atividade péptica em animais tratados com Boldina e omeprazol, respectivamente, em relação ao grupo veículo.

A pepsina pode ser um agente que possui a ação de degradação proteica ativa em pH baixo (pH 1,8–2,0), sua atividade elevada e exposição contínua ao suco gástrico podem induzir dano à parede do estômago. Como a atividade da pepsina poderia induzir dano na parede gástrica, a menor atividade da pepsina a um pH mais alto no estômago poderia suprimir a deterioração do estômago. Portanto, a inibição da secreção e atividade da pepsina seria um alvo muito importante no tratamento de distúrbios gástricos do ácido gástrico (LEE et al., 2018). A administração de omeprazol promove a redução da acidez gástrica, e por conseguinte; a clivagem do pepsinogênio em pepsina ativa (ARAI; GALLERANI, 2011). Contudo, provavelmente esse não foi o modo de ação desempenhado pelo alcaloide Boldina, que demonstrou efeito na inibição da atividade da pepsina, porém não foi capaz de reduzir a acidez gástrica.

Neste cenário, foi avaliada a hipótese de inibição direta por meio de uma complexação com a pepsina como demonstrado no trabalho de Wang et al (2013) no qual houve a formação de um complexo entre quatro alcaloides e a pepsina, o que promove sua desativação. Baseado nisso foi executada a análise da atividade *in vitro* da Boldina agindo sobre pepsina onde pode-se observar os níveis de tirosina obtidos pela clivagem péptica da albumina durante os tempos de 40 minutos e 100 minutos. Assim, foi possível observar que ao fim do tempo de incubação de 100 minutos o alcaloide inibiu totalmente a atividade da pepsina em todas as concentrações testadas, indicando uma provável habilidade de inibir diretamente a atividade da enzima, seja por ligação no sítios de ação, seja por mecanismos alostéricos.

## 9 CONCLUSÃO

A Boldina apresentou atividade cicatrizante gástrica na dose de 100 mg/kg, efeito que não se relacionou a um mecanismo de inibição da secreção ácida gástrica, mas que pode colaborar para inibição da atividade péptica do suco gástrico. Em paralelo foi evidente que a inibição de migração de neutrófilos no tecido (evidenciada pela indireta diminuição na atividade da MPO) e o aumento do conteúdo de mucinas, e diminuição do estresse oxidativo, participam do efeito cicatrizante gástrico da Boldina.

Sendo assim, não houve estudos com relação a atividade da enzima gástrica H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ATPase, podendo ser um possível sítio do mecanismo de ação.

Em associação, os dados obtidos contribuem para validação científica do uso popular de *Peumus Boldus* Molina para o tratamento da úlcera gástrica. Contudo mais estudos são necessários para detalhar o mecanismo de ação, bem como para avaliar os efeitos tóxicos e então garantir o uso seguro desta planta medicinal.

## 10 REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase. **Methods in Enzymol**, v.105, p. 121–126, 1984.
- AIRES, M. M. et al. **Fisiologia**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- ALLEN, FLEMSTROM, G. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. **American journal of cell physiology**, p. C1–C19, 2005.
- ALMEIDA, E.R.; MELO, A.M.; XAVIER, H. Avaliação toxicológica do extrato hidroalcoólico das folhas secas de *Peumus boldus* e Boldina em ratos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, p. 99-102, 2000.
- AMBROSONE CB. Oxidants and antioxidants in breast cancer. **Antioxidants & Redox Signaling**. v. 2, p.903-917, 2000.
- ANSON, M.L. The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. **The Journal of General Physiology**. v. 22, n.1, p. 79-89, 1938.
- ARAI, A. E.; GALLERANI, S. M. C. Uso crônico de fármacos inibidores da bomba de prótons: eficácia clínica e efeitos adversos. Especialização em Farmacologia. UNIFIL. Londrina, 2011.
- ATAY, S, TARNAWSKI, A. S, DUBOIS, A. Eicosanoids and the stomach. **Elsevier Science**, v. 61, p. 105–124, 2000.
- AKERELE, O. Summary of WHO guidelines for the assessment of herbal medicines. **HerbalGram**, v. 28, p.13-19, 1993.
- BARROS, G. F., SAAVEDRA, S. C., LIBERONA, L., FUENTES, W. A., TIRAPÉGUID, C., MATTAR, C., & CASSELSC, B. K. Variation of the alkaloid content of *Peumus boldus* (boldo). **Fitoterapia**, p. 179-185, 2018.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: Fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 23, n. 3, p. 679-688, 2009.
- BERNARDO, G.O; SOUSA, S.R; BERNARDO, C.O; FARACO, A.J. Perfil epidemiológico dos pacientes diagnosticados com úlcera gástrica e ou duodenal em dois serviços de referência do extremo sul Catarinense no período de um ano. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, n.. 46, v. 3, p.59-69, 2017.
- BIGHETTI, A. É., ANTÔNIO, M. A., & CARVALHO, J. E. Regulação e modulação da secreção gástrica. **Revista de Ciências Médicas**, p. 55-60, 2002.
- BRADLEY, P.P.; PRIEBAT, D.A; CHRISTENSEN, R.D.; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an

- enzyme marker. **The Journal of Investigative Dermatology**, V.78(3), p.206–209, 1982.
- BODY, S.C.; SASAME, H.A.; BODY, M.R. High concentrations of glutathione in glandular stomach: possible implications for carcinogenesis. **Science.**, v. 205, n. 4410, p.1010-1012, 1979.
- BOU-ABBOUD, C. F.; WAYLAND, H.; PANLSEN, G. e GUTH, P. H. Microcirculatory stasis precedes tissue necrosis in ethanol-induced gastric mucosal injury in rat. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 33, n. 7, p. 872-877, 1988
- CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, v.55, n.3, p.37-39, 2003.
- CALIXTO, JB. The role of natural products in modern drug discovery. **Anais Academia Brasileira de Ciências** 91, 2019.
- CHEN,K.S, KO,F.N, TENG,C.M, WU, Y.C. Antiplatelet and Vasorelaxing Actions of Some Aporphinoids, **Journal of Medicinal Plant and Natural Product Research**, v. 62, p. 133-136, 1996.
- CUSTÓDIOA,D.L.,JUNIOR,V.F.D.V,DASA,D.,MAITI,S.,MAITI,T.K.,ISLAM A,S.S.A new arabinoxylan from green leaves of *Litsea glutinosa* (Lauraceae): Structural and biological studies.**Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 1243–12, 2013.
- CNUBBEN, N. H., RIETJENS , I. M., WORTELBOER , H., ZANDEN, J. V., & BLADEREN, P. J. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, p. 141–152, 2001.
- CRYER, B, & MAHAFFEY, K. W. Gastrointestinal ulcers, role of aspirin, and clinical outcomes: pathobiology, diagnosis, and treatment. **Journal of Multidisciplinary Healthcare**, p. 137–146, 2014.
- DA SILVA, L. M. Mecanismos de ação envolvidos no efeito gastroprotetor do extrato etanólico de *Arctium lappa* L. em úlceras gástricas crônicas induzidas por ácido acético em ratos. 2010, 100 f. Dissertação (Mestrado em farmacologia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, 2010.
- DE CASTRO, D.S, DA SILVA, D.B, TIBÚRCIO, J.D, SOBRAL, M.E, FERRAZ V, TARANTO, A. G, SERRÃO, J.E, DE SIQUEIRA, J.M, ALVES, S.N. Larvicidal activity of essential oil of *Peumus boldus* Molina and its ascaridole-enriched fraction against *Culex quinquefasciatus*. **Experimental Parasitology**. v.171, p. 84-90, 2016.
- DELOURME J. Action intestinale de la boldine. **Comptes rendus de l'Académie des Sciences**, v. 229, p. 953-955, 1949.

DE LA HERAS B, RIOS JL, MARTINEZ-MIR I, RUBIO E. A study of the adrenergic activity of the alkaloids boldine and glaucine. **Pharmazie**; v. 45, p. 443-444, 1990.

DE LIMA , J. S., CABREBRA , M. P, CASAZZA, A. A, DA SILVA , M. F, PEREGO, P, DE CARVALHO JR, L. B & CONVERTI, A. Immobilization of *Aspergillus ficuum* tannase in calcium alginate beads and its application in the treatment of boldo (*Peumus boldus*) tea. **International Journal of Biological Macromolecules**, p 1989–1994 , 2018.

DE YOUNG, L.M; KHEIFETS, J.B; BALLARON, S.J; YOUNG, J.M. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. **Agents and Actions Journal**, v. 26(3-4), p.335–341, 1989.

DHINGRA, D; SONI, K. Behavioral and biochemical evidences for nootropic activity of boldine in young and aged mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 97, p. 895-904, 2018.

DIAS, N,S et al. Análise de prontuários de pacientes com gastrite em um hospital na região oeste do estado de goiás. **Revista Faculdade Montes Belos**, v. 8, n. 1, p.1-9, 2015.

DINIZ, P, B,F. Efeitos gastroprotetores do timol em úlceras agudas e crônicas em ratos: evidências do envolvimento das prostaglandinas, canais para potássio sensíveis a ATP e secreção do muco gástrico. 2016. 99 f. Tese (Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE, 2016.

DI STEFANO, M; MICELI, E; CORAZZA, G. R, Disponível em: <http://www.farmacista33.it/cont/download-center-files/23940/cap-rugarli-x26505allp1.pdf> Acesso em: 19 mar, 2019.

DOMER, F.R. Animail experiments in pharmacological analysis. **Charles C. Thomas Publisher**, p. 669, 1971.

DONATINI, R. S; ISHIKAWA, T; BARROS, S. B. M; BACCHI, E. M. Atividade antiúlcera e antioxidante do extrato de folhas de *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19,p. 89-94, 2009.

DUTRA, R,C; CAMPOS, M,M; SANTOS, A, R,S;CALIXTO, J.B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v.112, p. 4–29, 2016.

EDDLESTON, J.Stress ulceration in the critically ill population,. Vincent (ed) Yearbook of intensive care medicine. **Springer, Berlin**, p 649–655, 1998.

- ELLIOT SN, MSKINIGT W, CIRINO G, WALLACE JL. A nitric oxide-releasing nonsteroidal anti-inflammatory drug accelerates gastric ulcer healing in rats. **Gastroenterology**; v.109, p.524-30, 1995.
- FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S.. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista Brasileira de Medicina**, v.43, n.1 p.61-68, 1997.
- FETROW, C. W; AVILA, J. R. **Manual de medicina alternativa para o profissional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
- FERNÁNDEZ, J, LAGOS, P. RIVERA, P, ZAMORANO-PONCE, E. Effect of boldo (*Peumus boldus* Molina) infusion on lipoperoxidation induced by cisplatin in mice liver. **Phytotherapy Research**, v. 23, p. 1024–1027, 2009.
- FIALKOW, L.; WANG, Y.; DOWNEY, G.P. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 42, n.2, p. 153-164, 2007.
- GERHARDT.D, HORN. A.P,GAELZER,M.M, FROZZA, R.L, CAÑEDO, A.D, PELEGRINI. A.L, LENZ, G, HENRIQUES, A.T, SALBEGO, C. Boldine: a potential new antiproliferative drug against glioma cell lines. **Investigational New Drugs**. v. 27, p. 517-525, 2009.
- GONZÁLEZ-CABELLO R, SPEISKY H, BANNACH R, VALENZUELA A, FEHÉR J, ET AL.Effects of boldine on cellular immune functions in vitro. J Investig, **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, v.4, p. 139-145, 1994.
- GIELEN K, GOOSSENS A. Occupational allergic contact dermatitis from drugs in healthcare workers. **Contact Dermatitis**, v.45, p. 273-279, 2001.
- GRANERO-MELCON, B; MORRÁS,I; GALÑAN-DEJUANA,M; ABAD-SANTOS,F. Appropriateness of the use of proton pump inhibitors in the Emergency Department of a Spanish university hospital. **Revista Española de Enfermedades Digestivas**, v. 1, n. 1, p.1-18, 2018.
- GÓMEZ, Gonzalo; VELARDE, Victoria. Boldine Improves Kidney Damage in the Goldblatt 2K1C Model Avoiding the Increase in TGF- $\beta$ . **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 19, n. 7, p.1864-1881, 2018.
- GUYTON, Arthur C; HALL, John E. **Fundamentos de Guyton: tratado de fisiologia médica**. Rio de Janeiro, RJ: Editora Guanabara Koogan, 2002.
- HABIG, W.H; PABST, M.J; FLEISCHNER, G; GATMAITAN, Z; ARIAS, I.M; JAKOBY, W.B. The identity of glutathione S-transferase B with ligandin, a major

binding protein of liver. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.71, n.10, p. 3879-82, 1974.

HAMAISHI, K.; KOJIMA, R.; ITO, M. Anti-ulcer effect of tea catechin in rats. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 11, p. 2206-2213, 2006.

HELLOU, J, ROSS , N. W, & MOON , T. W. Glutathione, glutathione S-transferase, and glutathione conjugates complementary markers of oxidative stress in aquatic biota. **Springer-Verlag**, p. 2007-2012, 2012.

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

HOU, Y.C., JANCZUK, A., WANG, P.G. Current trends in the development of nitric oxide donors. **Current Pharmaceutical Design**. 5 (6), p. 417–441, 1999.

HORSA , B. A, AYELE , Y, & AYALEW, M. B. Assessment of pharmacologic prophylaxis use against stress ulcer in the medical wards of University of Gondar Hospital. **SAGE Open Medicine**, V. 7, p. 1-6, 2019.

IZZO AA, CARLO GD, BORRELLI F, ERNST E. Cardiovascular pharmacotherapy and herbal medicines: the risk of drug interaction. **International Journal of Cardiology**, v. 98, p.1 – 14, 2005.

JIMÉNEZ , I, GARRIDO , A, BANNACH, R, GOTTELAND, M, SPEISKY, H. Protective Effects of Boldine Against Free Radical-induced Erythrocyte Lysis. **Phytotherapy Research** , p. 339–343, 2000.

KALLAYA, E; SUTHILUK, P; NARUEMON, V; DUANGPORN, T. Effects of Aloe vera and sucralfate on gastric microcirculatory changes, cytokine levels and gastric ulcer healing in rats. **World Journal of Gastroenterology**, v. 7, n.12, p. 2034-2039, 2006.

KANGWAN, N; PARK, J. M; KIM, E. H; HAHM, K. B. Quality of healing of gastric ulcers: Natural products beyond acid suppression. **World Jornal Gastrointest Pathophysiolv**, n. 1, p. 40-47, 2014.

KAZUMORI, H., ISHIHARA, S., & RUMI, M. A. Transforming growth factordirectly C decarboxylase and vesicular monoamine transporter 2 production in rat enteochochromaffin-like cells. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, p. 508-514, 2004.

KIERSZENBAUM, A; TRES, L.L. **Histologia e Biologia Celular**. 3 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

KEMMERLY, T; KAUNITZ, J.D. Gastroduodenal mucosal defense. **Current Opinion in Gastroenterology**. v.30, n. 6, p.583–588, 2014.



- KUMAR , V. et al. **Robbins e Cotran: bases patológicas das doenças**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier , 2010.
- KUSTER, J.G; VLIET, A.H.M.V; KUIPERS. E.J. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. **Clinical Microbiology Reviews**, p. 449–490, 2006.
- KWIECIEN, S; BRZOZOWSKI, T; KONTUREK, S. J. Effects of reactive oxygen species action on gastric mucosa in various models of mucosal injury. **Journal of Physiology and Pharmacology**. v.53, p.39-50, 2002.
- LAINE, L; TAKEUCHI, K; TARNAWSKI, A. Gastric Mucosal Defense and Cytoprotection: Bench to Bedside. **Gastroenterology**, v.135, p.41–60, 2008.
- LAINE, L, HOPKINS, R. J, GIRARDI, L. S. Has the Impact of *Helicobacter pylori* Therapy on Ulcer Recurrence in the United States Been Overstated. **The American Journal of Gastroenterology**, p. 1409-1415, 1998.
- LEE, J.K et al. Alleviation of ascorbic acid-induced gastric high acidity by calcium ascorbate *in vitro* and *in vivo*. **The Korean Journal Of Physiology & Pharmacology**,v. 22, n. 1, p.35-42, 2018.
- LEUNG, F.W; MILLER, J. C; GUTH, P.H. Dissociated Effects of Misoprostol on Gastric Acid Secretion and Mucosal Blood Flow. **Digestive Diseases and Sciences**, V. 31, N. 2, p. 86S-90S,1986.
- LAU, Y. S; TIAN, X. Y; HUANG, Y; DHARMANI, M; ACHIKE, F. I.; MUSTAFA , M. R. Boldine protects endothelial function in hyperglycemia-induced oxidative stress through an antioxidant mechanism. **Biochemical Pharmacology**, p.367-375, 2012
- LAU, Y,S; MACHHA, A; ACHIKE, F.I; MURUGAN,D. MUSTAFA, M, R.The aporphine alkaloid boldine improves endothelial function in spontaneously hypertensive rats. **Experimental Biology and Medicine**, v. 237, p. 93–98, 2012.
- LEITÃO, F; LEITÃO, S.G; FONSECA-KRUELB, V.S; SILVAC, I.M; MARTINS, K. Medicinal plants traded in the open-air markets in the State of Rio de Janeiro, Brazil: an overview on their botanical diversity and toxicological potential. **Revista Brasileira Farmacognsia**, v 24, p. 225-247, 2014.
- MARTIN, J.S; DOLL, U. *Peumus boldus* mol. (monimiaceae, magnoliopsida) una especie silvestre promisorio de chile. **Ediciones Universidad de Salamanca**, p. 109-118, 1998.
- MARTÍN V, HERRERA F, GARCÍA-SANTOS G, ANTOLÍN I, RODRIGUEZ-BLANCO J, RODRIGUEZ C. Signaling pathways involved in antioxidant control of glioma cell proliferation. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 42, p. 1715-1722, 2007.

MARTÍNEZ, L.A.; RIOS, J.L.; PAYÁ, M.; ALCARAZ, M.J. Inhibition of nonenzymic lipid peroxidation by benzylisoquinoline alkaloids. **Free Radical Biology Medicine**. v.12, p.287-292, 1992.

MARKLUND, S; MARKLUND, G. Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. **European Journal of Biochemistry** v.47, p. 469-474, 1974..

MEISTER , A., & ANDERSON , M. E. Glutathione. **Annual Reviews Biochemistry**, 711-760, 1983.

MELO, J. G; NASCIMENTO, V. T; AMORIM, E. L; ANDRADE LIMA, C. ; ALBUQUERQUE, U. P. Avaliação da qualidade de amostras comerciais de boldo (*Peumus boldus* Molina), pata-de-vaca (*Bauhinia spp.*) e gínco (*Ginkgo biloba* L.). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 14(2), p. 111-120, 2004.

MENDES BG, MACHADO MJ, FALKENBERG M. Triagem de glicolípídios em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p. 568-575, 2006.

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.

MONZÓN S, LEZAUN A, SÁENZ D, MARQUINEZ Z, BERNEDO N, URIEL O, COLAS C, DUCE F. Anaphylaxis to boldo infusion, a herbal remedy. **Allergy** v. 59, p. 1019-1020, 2004.

MOWRY R, WINKLER CH. The coloration of acidic carbohydrates of bacteria and fungi in tissue sections with special reference to capsules of *Cryptococcus neoformans*, *Pneumococci* and *Staphilococci*. **The American Journal of Pathology** 32: 628–629 1956.

NIV, Y.; BOLTIN, D; HALPERN, M; COHEN, M; LEVI, Z; VILKIN, A; MORGENSTERN, S; MANUGIAN, V; LAWRENCE, E.S.T; GAGNEUX, P; KAUR, S; SHARMA, P; BATRA, S. K; HO, S.B. Membrane-bound mucins and mucin terminal glycans expression in idiopathic or *Helicobacter pylori* , NSAID associated peptic ulcers. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 40, p. 14913-14920, 2014.

NOUREINI et al. Telomerase Inhibition by a New Synthetic Derivative of the Aporphine Alkaloid Boldine. **International Journal of Molecular Science**, p. 1-14, 2018.

NOUREINI, S.K; TANAVAR, F. Boldine, a natural aporphine alkaloid, inhibits telomerase at non-toxic Concentrations. **Chemico-Biological Interactions**, v. 231, p. 27–34, 2015.

- OLBE, L.; CARLSSON, E.; LINDBERG, P. A proton - pump inhibitor expedition: the case histories of omeprazole e esomeprazole. **Nature Reviews Drug Discovery.**, v.2, 2003.
- O'BRIEN,P, POZO,C.C, SPEISKY, H. Boldine and its antioxidant or health-promoting properties. **Chemico-Biological Interactions**, p.1-17, 2006.
- PANDURANGAN,A.K. MOHEBALI, N. HASANPOURGHADI, M. LOOI , C. Y. MUSTAFA , M. R. ESA, N. M. Boldine suppresses dextran sulfate sodium-induced mouse experimental colitis:NF-kB and IL-6/STAT3 as potential targets. **BioFactors**, p.247-258, 2016.
- PAYDAR, M., KAMALIDEHGHAN, B., WONG, Y. L., MUSTAFA , M. R., & LOOI, C. Y. Evaluation of cytotoxic and chemotherapeutic properties of boldine in breast cancer using *in vitro* and *in vivo* models. **Dove press Journal** , p.719-733, 2014.
- PAYDAR,M.,KAMALIDEHGHAN,B.,WONG,Y.L.,WONG,W.F.,LOOI,C.Y., MUSTAFA,M.R.Evaluation of cytotoxic and chemotherapeutic properties of Boldina in breast cancer using *in vitro* and *in vivo* models. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 8, p. 719–733, 2014.
- PEREIRA, I.T; BURCI, L.M; DA SILVA, L.M; BAGGIO, C.H; HELLER, M; MICKE, G.A; PIZZOLATTI, M.G; MARQUES, M.C; WERNER, M.F. Antiulcer effect of bark extract of *Tabebuia avellaneda*: activation of cell proliferation in gastric mucosa during the healing process. **Phytotherapy Research.**, v. 27, n. 7, 1067-1073, 2013.
- PHILLIPS.O; GENTRY, A.H. The useful plants of Tambopata, Peru: Statistical hypotheses tests with a new quantitative technique. **Economic Botany**, v 47, n. 1, p. 15-32, 1993.
- PIETTA P, MAURI P, MANERA E, CEVA P 1988. Determination of isoquinoline alkaloids from *Peumus boldus* by high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v.457, p. 442-445, 1988.
- RANG, H.P; DALE, M.M; RITTER, J.M; MOORE. R.K. **Farmacologia**. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.
- RIBBONS, K.A., ZHANG, X.J., THOMPSON, J.H., GREENBERG, S.S., MOORE, W.M., KORNMEIER, C.M., CURRIE, M.G., LERCHE, N., BLANCHARD, J., CLARK, D.A., et al. Potential role of nitric oxide in a model of chronic colitis in rhesus macaques. **Gastroenterology** 108 (3), 705–711, 1995.

- ROBERTSON, M. S., CLANCY, R. L., CADE, J. F. *Helicobacter pylori* in intensive care: why we should be interested. **Intensive Care Medicine**, p. 1881–1888, 2003.
- ROSS, M. H; PAWLINA, W. **Histologia: texto e atlas: em correlação com biologia celular e molecular**. 6. ed. São Paulo, SP: Editora Guanabara Koogan, 2012
- ROZZA, A.L; HIRUMA-LIMA, C. A; TANIMOTO, A; PELLIZZON, C. H. Morphologic and Pharmacological Investigations in the Epicatechin Gastroprotective Effect. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine** v.2012, p. 1-8, 2012.
- SALINAS, R.H, VIELMA, A.Z, ARISMENDI, M.N, Boric, M. P, Sáez, J.C, Velarde.V. Boldine Prevents Renal Alterations in Diabetic Rats. **Journal of Diabetes Research**, p. 1-12, 2013.
- SANTOS, A.C; VARGAS, A.C. Mecanismos antioxidantes envolvidos no efeito gastroprotetor do alcaloide Boldina. 2018. 20f. Monografia (Curso de Nutrição). Universidade do Vale do Itajaí, Santa Catarina, 2018.
- SCHMEDA-HIRSCHMANN G1, RODRIGUEZ JA, THEODULOZ C, ASTUDILLO SL, FERESIN GE, *Tapia* A. Free-radical scavengers and antioxidants from *Peumus boldus* Mol. ("Boldo"). **Free Radical Biology & Medicine**. v.37, n 4 p.447-52, 2003.
- SCHMEDA-HIRSCHMANN, G; YESILADA, E. Traditional medicine and gastroprotective crude drugs. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 61–66, 2005.
- SEDLAK, J., LINDSAY, R.H. Estimation of total prote in bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissues with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 25, 192–205, 1968
- SCHUBERT, M. L., PEURA, D. A. Control of Gastric Acid Secretion in Health and Disease. **Gastroenterology**, 1842–1860, 2008.
- SCHWANZ, M. Desenvolvimento e Validação de Método Analítico para Quantificação da Boldina em *Peumus boldus* Mol. (Monimiaceae) e Avaliação Preliminar de sua Estabilidade. Univesidade federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2006.
- SLAGA TJ. Inhibition of the induction of cancer by antioxidants. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 369, p. 167-174, 1995.
- SPEISKY, H.; CASSELST, K. Boldo and boldine: an emerging case of natural drug development. **Pharmacological Research**, Chile , v. 29, n. 1, p. 1-12, 1994.

- SPEISKY, H., CASSELS, B. K., LISSI, E. A., & VIDELA, L. A. Antioxidant properties of the alkaloid boldine in systems undergoing lipid peroxidation and enzyme inactivation. **Biochemical pharmacology**, v.41, n.11, p.1575-1581, 1991.
- SPEISKY H, SQUELLA JA, NTIFIEZ-VERGARA LJ. Activity of boldine on rat ileum. **Journal of Medicinal Plant and Natural Product Research**, v. 57, p, 519-522, 1991.
- SUNG, N.Y.; CHOI, K.S.; PARK, E.C.; PARK, K.; LEE, S.Y. LEE, A.K.; CHOI, I. J.; JUNG, K. W.; WON, Y.J.; SHIN, H. R. Smoking, alcohol and gastric cancer risk in Korean men: the National Health Insurance Corporation Study. **British Journal of Cancer**, v. 97, n. 5, p. 700-704, 2007.
- STÉVIGNY, C,C.; BAILLY, C; QUETIN-LECLERCQ,J. Cytotoxic and Antitumor Potentialities of Aporphinoid Alkaloids. **Current Medicinal Chemistry**. v.5, p.173-182, 2005.
- STERNBERG,S.S. **Histology for pathologists**. 2.ed. Philadelphia, PA [EUA]: Lippincott-Raven, 1997.
- TANAKA, A., KUNIKATA, T., MIZOGUCHI, H., KATO, S., TAKEUCHI, K.,Dual action of nitric oxide in pathogenesis of indomethacin-induced small intestinal ulceration in rats. **Journal of physiology and pharmacology**. 50 (3), p. 405–417, 1999.
- TARNAWSKI, A.; AHLUWALIA, A.; JONES, M.K. Gastric cytoprotection beyond prostaglandins: cellular and molecular mechanisms of gastroprotective and ulcer healing actions of antacids. **Current Pharmaceutical Design**, 2013.
- TAKAGI, E.; OKABE, S.; SAZIKI, R.A new method for the production of chronic gastric ulcer in rats and effect of several drugs on healing.**Japanese Journal of Pharmacology**. v. 19, p.416-426, 1969.
- TENG,C.M, HSUEH,C,M, CHANG,Y.L, KO, F,N, LEE, S.S. AND KARIN
- TOLEDO DIAS, L. F.; MELO, E. S.; HERNANDES, L. S.; BACCHI, E. M. Atividade antiúlcera e antioxidante *Baccharis trimera*(Less) DC (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 1B, n. 19, p. 309-314, 2009.
- TOLENTINO, B. Estudo pré clínico do potencial gastroprotetor do alcaloide Boldina. 2017. 16f. Monografia.( Curso de Nutrição). Universidade do Vale do Itajaí, Santa Catarina, 2017.
- THOMAS, C. C, DOMER, F.R. Animal experiments in pharmacological analysis. **Publisher**, p. 669, 1971.
- TRIBESS, B.; PINTARELLI, G. M.; BINI, L. A.;CAMARGO, A.;FUNEZ, L A.; DE GASPER, A. L., ZENI, A. L. B. Ethnobotanical study of plants used for

therapeutic purposes in the Atlantic Forest region, Southern Brazil. **Journal Of ethnopharmacology**, v. 164, p.136-146, 2015.

URZLIA, A.; ACUFIA, P. Alkaloids from the bark of *Peumus boldus*. **Fitoterapia**, v. 54, p. 175-177, 1983.

VANE, J.R.; BOTTING, R.M. New insights into the mode of action of anti-inflammatory drugs. **Inflammation Research** v. 544, 1999.

WANG, Y. S., QIWEN, Z., LI, B. T., ZHANG, H.B., HUAYANG, J.H. Ethnobotany, phytochemistry, and pharmacology of the genus *Litsea*: An update. **Journal of Ethnopharmacology**, p.66, 2016.

WANG, RUIYONG et al. Comparative study of the binding of pepsin to four alkaloids by spectrofluorimetry. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 108, p.62-74, 2013.

WILLIAMSON, E.; DRIVER, S.; BAXTER, K. **Interações Medicamentosas de Stockley: Plantas Medicinais e Medicamentos Fitoterápicos**. Editora Artemed, Porto Alegre – RS, 2012.

WOLLIN, A; CODE, C. F; DOUSA, T. P. Interaction of prostaglandins and histamine with enzymes of cyclic AMP metabolism from guinea pig gastric mucosa. **The journal of clinic investigation**, p.1548-1553, 1976.

YU, B; COOK, C; SANTANAM, N. The Aporphine Alkaloid Boldine Induces Adiponectin Expression and Regulation in 3T3-L1 Cells. **Journal of medicinal food**. v. 12 (5), p. 1074–1083, 2009.