



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ  
PRÓ- REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO  
CAMPUS MINISTRO REIS VELLOSO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**LUCAS DE ARAÚJO BASTOS SANTANA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIDIARREICA DE PROTEÍNAS DO LÁTEX DE  
*Plumeria pudica* (JACQ., 1760)**

**PARNAÍBA  
2016**

**LUCAS DE ARAÚJO BASTOS SANTANA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIDIARREICA DE PROTEÍNAS DO LÁTEX DE  
*Plumeria pudica* (JACQ., 1760)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Piauí, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Linha de Pesquisa: Química e Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Jefferson Soares de Oliveira.

PARNAÍBA  
2016

FICHA CATALOGRÁFICA  
Universidade Federal do Piauí  
Biblioteca Setorial Prof. Cândido Athayde – Campus Parnaíba  
Serviço de Processamento Técnico

S232a Santana, Lucas de Araújo Bastos.  
Avaliação da atividade antidiarreica de proteínas do látex de *Plumeria pudica* (JACQ., 1760) [manuscrito] / Lucas de Araújo Bastos Santana. – 2016.  
55 f. : il. color.

Impresso por computador (printout).  
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Piauí, 2016.  
Orientação: Prof. Dr. Jefferson Soares de Oliveira.

1. Proteínas Laticíferas. 2. Proteína - Látex. 3. Látex - *Plumeria pudica*.  
4. Diarreia. I. Título.

CDD: 660.6

LUCAS DE ARAÚJO BASTOS SANTAMA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIDIARREICA DE PROTEÍNAS DO LÁTEX DE  
*Plumeria pudica* (JACQ., 1760)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Piauí, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

BANCA EXAMINADORA:

---

Prof. Dr. Jefferson Soares de Oliveira  
Departamento de Biomedicina  
Universidade Federal do Piauí  
(ORIENTADOR)

---

Prof. Dr. Daniel Fernando Pereira Vasconcelos  
Departamento de Biomedicina  
Universidade Federal do Piauí

---

Prof. Dr. Gustavo Portela Ferreira  
Departamento de Biomedicina  
Universidade Federal do Piauí

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente ao grandioso Deus, por ter me concedido o dom da vida e pelas graças recebidas.

Ao meu presado orientador Prof. Dr. **Jefferson Soares de Oliveira**, por seu apoio, paciência, atenção e também pelo compartilhamento de seus conhecimentos. Mais que um orientador, foi amigo e conselheiro, sendo de fundamental importância em meu crescimento acadêmico e pessoal.

Ao Prof. Dr. **Daniel Fernando Pereira Vasconcelos**, por ter aceitado prontamente o convite para participar da minha qualificação e defesa, colaborando com a sua riqueza científica.

Ao Prof. Dr. **Gustavo Portela Ferreira**, por ter aceitado prontamente o convite para participar da minha qualificação e defesa, colaborando com a sua riqueza científica.

Aos colegas de laboratório **Diêgo Passos Aragão** e **Lucas Eduardo Silva Oliveira**, pela ajuda e companheirismo.

Ao **Luan Kelves Miranda de Souza**, **Nayara Alves de Sousa** e **Thiago de Souza Lopes Araújo**, pela colaboração nos experimentos de laboratório.

Ao **BIOMIC** e **LAFEX**, laboratórios onde realizei meus experimentos.

A minha amada família: meus pais **Edson Manoel de Santana** e **Cleonice de Araújo Bastos Santana** e irmã **Alessandra de Araújo Bastos Santana**, que estiveram sempre ao meu lado, nos momentos bons e ruins, me apoiando na tomada de decisões. Vocês são a maior riqueza que possuo.

A minha segunda família, em especial a **Karla Vasconcelos de Araújo**, pelo grande companheirismo e ajuda durante essa trajetória e a seus pais **Francisco Antônio Cardoso de Araújo** e **Francivani Amorim Vasconcelos de Araújo**, pelo acolhimento.

As demais familiares e amigos, que sempre estiveram me dando apoio e carinho.

Ao Conselho de Apoio a Pesquisa – CAPES, pelo financiamento que gerou esse trabalho.

A Universidade Federal do Piauí, através do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia por possibilitar a realização do Curso de Mestrado.

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para essa realização.

## EPÍGRAFRE

*O insucesso é apenas uma oportunidade para  
recomeçar de novo com mais inteligência.*

**Henry Ford**

## RESUMO

### **Título: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIDIARREICA DE PROTEÍNAS DO LÁTEX DE *Plumeria pudica* (JACQ., 1760)**

O látex vegetal é um fluido de aspecto leitoso liberado por certas espécies quando estas sofrem algum tipo de injúria mecânica, e configura-se como importante fonte de compostos bioativos. Vários artigos descrevem propriedades farmacológicas de compostos obtidos a partir de látex, como exemplo do látex de *Plumeria pudica*, que demonstrou apresentar atividade anti-inflamatória e antinociceptiva. Nesse contexto, o presente trabalho teve como principal objetivo avaliar a capacidade de proteínas obtidas a partir do látex de *P. pudica* em interferir na atividade antidiarreica em camundongos, utilizando modelos de diarreia induzidos por óleo de rícino. Primeiramente o látex de *P. pudica* foi coletado e fracionado, e o produto resultante foi denominado de PL e utilizado nos demais experimentos. PL foi submetido a tratamento térmico e químico com o intuito de identificar a natureza da amostra, e as diferentes frações foram avaliadas por eletroforese (SDS-PAGE). Foram feitos ensaios biológicos para testar a atividade de PL nos modelos de diarreia induzida por óleo de rícino, *enteropooling* e trânsito gastrointestinal. Concomitantemente foram feitas dosagens dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) e malondialdeído (MDA) na mucosa intestinal, marcadores de estresse oxidativo. Os resultados demonstraram que a administração de PL (10, 20 e 40mg/kg, *i.p.*) reduziu significativamente ( $p < 0,05$ ) o número de fezes totais e diarreicas, bem como à gravidade da diarreia em camundongos, no modelo de diarreia induzida por óleo de rícino. Os maiores valores de inibição de fezes totais (70,51%) e diarreicas (59,70%) foram obtidos no grupo pré-tratado com PL (40mg/kg, *i.p.*), dose esta utilizada nos demais ensaios biológicos. O grupo que recebeu loperamida (LOP) (5mg/kg, *v.o.*), droga utilizada para tratamento e estudo da diarreia, também reduziu significativamente ( $p < 0,05$ ) a quantidade de fezes totais (74,87%) e diarreicas (73,00%). A atividade antidiarreica foi perdida quando a fração PL foi submetida a tratamento térmico, demonstrando que as proteínas com ação antidiarreica são sensíveis ao aumento de temperatura. Entretanto, a fração PL coletada com iodoacetamida conservou sua atividade, evidenciando que o efeito antidiarreico não está envolvido com a ação de proteases cisteínicas. Uma avaliação do perfil de proteínas presentes na fração PL, por meio de eletroforese, demonstrou significativas alterações no conteúdo proteico de PL após os tratamentos térmico e químico. No ensaio de *enteropooling*, observou-se que PL (40mg/kg, *i.p.*) reduziu o volume de secreção de fluido no lúmen intestinal (31,42%), e como esperado, o grupo LOP (5mg/kg, *v.o.*) também reduziu a secreção (40,00%) ( $p < 0,05$ ). Além disso, PL (40mg/kg, *i.p.*) diminuiu significativamente a distância percorrida por uma refeição de carvão vegetal no modelo de trânsito gastrointestinal, semelhante ao grupo LOP (5mg/kg, *v.o.*). PL reduziu significativamente os níveis de MDA e aumentou os níveis de GSH. Os dados obtidos demonstram que PL foi capaz de inibir a diarreia induzida por óleo de rícino e reduzir o estresse oxidativo intestinal.

**Palavras-chave:** proteínas laticíferas; diarreia; óleo de rícino; *enteropooling*.

## ABSTRACT

**Title: ANTIDIARRHEAL ACTIVITY EVALUATION OF LATEX PROTEIN *Plumeria Pudica* (JACQ., 1760)**

Vegetable latex is a milky fluid released by certain species when they suffer some kind of mechanical injury and is configured as an important source of bioactive compounds. Various articles describe the pharmacological properties of compounds obtained from latex, as an example of *Plumeria pudica* latex, which was shown to have anti-inflammatory and antinociceptive activity. In that context, this study aimed to assess the ability of proteins from *P. pudica* (PL) latex to interfere in the antidiarrheal activity in mice using models diarrhea induced by castor-oil. First *P. pudica* latex was collected and fractionated, and the resulting product was named PL and used in the other experiments. PL was subjected to thermal and chemical treatment in order to identify the nature of the sample, and the different fractions were analyzed by electrophoresis (SDS-PAGE). Biological tests were performed to test the LP activity in models of diarrhea induced by castor oil, enteropooling and gastrointestinal transit. Concomitantly dosages were made of the levels of reduced glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) in the intestinal mucosa, markers of oxidative stress. The results showed that administration of PL (10, 20 and 40mg / kg, ip) significantly ( $p < 0.05$ ) the number of total diarrheal stool and as well as the severity of diarrhea in mice in induced diarrhea model by castor oil. The greatest inhibition of total feces values (70.51%) and diarrhea (59.70%) were obtained in the group pretreated with PL (40mg / kg, i.p.), a dose used in other bioassays. The group receiving loperamide (LOP) (5mg/kg, po), the standard drug for the study of diarrhea also significantly reduced ( $p < 0.05$ ) the total amount of faeces (74.87%) and diarrhea (73.00%). The antidiarrheal activity was lost when the PL fraction was subjected to heat treatment, demonstrating that proteins with antidiarrheal action are sensitive to increasing temperature. However, the PL fraction collected with iodoacetamide retained its activity, showing that the antidiarrheal effect is not involved with the action of cysteine proteases. A profile evaluation of proteins present in the fraction PL, by electrophoresis, showed significant changes in PL protein content after thermal and chemical treatments. In enteropooling test, revealed that PL (40mg/kg, ip) reduced the volume of fluid secretion in the intestinal lumen (31.42%), and as expected, the LOP group (5mg/kg, po) also reduced secretion (40.00%) ( $p < 0.05$ ). In addition, PL (40 mg / kg, ip) significantly reduced the distance traveled by the charcoal meal gastrointestinal transit model similar to the LOP group (5mg / kg, po). PL significantly reduced MDA levels and increased levels of GSH. The data obtained demonstrate that PL was able to inhibit the diarrhea induced by castor oil and reduce intestinal oxidative stress.

**Keywords:** laticiferas proteins; diarrhea; castor-oil; enteropooling.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Planta <i>Plumeria pudica</i> .....	22
<b>Figura 2.</b> Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) de proteínas solúveis do látex de <i>P. pudica</i> (PL) e tratamentos (PL+ IAA e PL 100°C).....	36
<b>Figura 3.</b> Efeitos de PL sobre a fluidez das fezes na diarreia induzida por óleo de rícino através de escores do grau de sujidade na porção proximal da calda em camundongos.....	37
<b>Figura 4.</b> Efeito de PL (40mg/kg, <i>i.p.</i> ) sobre o trânsito gastrointestinal em camundongos.....	38
<b>Figura 5.</b> O efeito de PL sobre os níveis de glutathiona (GSH) na mucosa intestinal de camundongos tratados com óleo de rícino.....	39
<b>Figura 6.</b> O efeito de PL na concentração de malondialdeído (MDA) na mucosa intestinal de camundongos tratados com óleo de rícino.....	40

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Efeito das proteínas do látex na diarreia aguda induzida por óleo de rícino.....	34
<b>Tabela 2.</b> Efeito de proteínas do látex submetidas a tratamento químico e físico na diarreia aguda induzida por óleo de rícino.....	35
<b>Tabela 3.</b> Efeitos de proteínas do látex sobre o acúmulo do fluido intestinal induzido pelo óleo rícino ( <i>enteropooling</i> ) em camundongos.....	37
<b>Tabela 4.</b> Efeitos de proteínas do látex submetidas a diferentes tratamentos sobre o acúmulo do fluido intestinal induzido pelo óleo rícino ( <i>enteropooling</i> ) em camundongos.....	38

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA:	Análise de variância
cAMP:	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
COBEA:	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DTNB:	5,5 ditídio-bis-(ácido-2-nitrobenzóico)
E.P.M.:	Erro padrão da média
g:	Gravidade
GSH:	Glutathiona
iNOS:	<i>Inducible nitric oxide synthase</i> (Óxido nítrico-sintase induzida)
IAA:	Iodoacetamida
<i>i.p.</i> :	Intraperitoneal
LOP:	Loperamida
MDA:	Malondialdeído
MPO:	Mieloperoxidase
NO:	<i>Nitric oxide</i> (Óxido Nítrico)
PAF:	Fator de ativação de plaquetária
PGs:	Prostaglandinas endógenas
PGE <sub>2</sub> :	Prostaglandina E <sub>2</sub>
PL:	Proteínas do látex de <i>Plumeria pudica</i>
RPM:	Rotações por minuto
Sal:	Salina
SDS:	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE:	Dodecil sulfato de sódio de poliacrilamida
Tris-HCl:	<i>Tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride</i>
<i>v.o.</i> :	Via oral
<i>v/v</i> :	Volume por volume

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	15
2.1 PLANTAS PRODUTORAS DE LÁTEX.....	15
2.1.1 Características físico-químicas do látex.....	16
2.2 PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS DE PLANTAS PRODUTORAS DE LÁTEX.....	17
2.2.1 Potencial antidiarreico e antissecretório do látex de plantas.....	18
2.2.2 O gênero <i>Plumeria</i> L. e a espécie <i>Plumeria pudica</i> (Jacq., 1760).....	20
2.3 DIARREIA.....	23
2.3.1 Epidemiologia das doenças diarreicas.....	23
2.3.2 Fisiopatologia das doenças diarreicas.....	24
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	27
3.1 OBJETIVO GERAL.....	27
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	28
4.1 COLETA E FRACIONAMENTO DO LÁTEX DE <i>Plumeria pudica</i> .....	28
4.2 TRATAMENTO DE PL COM CALOR.....	28
4.3 TRATAMENTO QUÍMICO DE PL.....	28
4.4 ELETROFORESE (SDS-PAGE).....	29
4.5 ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	29
4.5.1 Critérios éticos.....	30
4.5.2 Atividade das Proteínas do Látex de <i>Plumeria pudica</i> (PL) no modelo de diarreia induzida por óleo de rícino em camundongos: curva dose-resposta.....	30
4.5.3 Atividade das Proteínas do Látex de <i>Plumeria pudica</i> (PL) no <i>enteropooling</i> induzido por óleo de rícino em camundongos.....	31
4.5.4 Efeito das Proteínas do Látex de <i>Plumeria pudica</i> (PL) sobre o trânsito gastrointestinal: Modelo de trânsito gastrointestinal em	32

camundongos.....	
<b>4.6 ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....</b>	<b>32</b>
4.6.1 Determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) na mucosa intestinal.....	32
4.6.2 Determinação dos níveis de malondialdeído (MDA) na mucosa intestinal.....	33
<b>4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	<b>33</b>
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>34</b>
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>41</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>46</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>47</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>55</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Produtos naturais são amplamente utilizados na medicina popular. Estudos referentes a substâncias naturais são a preocupação central das ciências químicas e biológicas, servindo como fonte de inspiração para a condução de muitas descobertas farmacêuticas (MISHRA; TIWARI, 2011; RAO et al., 2015). Atualmente, apesar das pesquisas estarem mais voltadas para produtos sintéticos, produtos naturais continuam sendo utilizados como fontes de novos compostos bioativos, mantendo um grande impacto sobre a medicina moderna (WANG et al., 2012; RAO et al., 2015).

A descoberta de medicamentos a partir de fontes naturais envolve uma abordagem multifacetada, combinando conhecimentos na área da botânica, fitoquímica, ciências biológicas e técnicas moleculares. Assim, a descoberta de agentes terapêuticos à base de plantas, continua a ser uma área importante, onde buscas sistemáticas podem fornecer pistas valiosas contra vários alvos farmacológicos (SEN; SAMANTA, 2015).

Plantas e seus derivados são as principais fontes de compostos com atividade biológica ou farmacológica. Drogas à base de plantas são responsáveis por aproximadamente 30% de todos os produtos farmacêuticos (CALIXTO, 2005; MARTINS et al., 2015).

Vários estudos demonstram que o látex produzido por algumas espécies de plantas é fonte natural de compostos biologicamente ativos e muitas enzimas hidrolíticas responsáveis por diversos benefícios para a saúde. Nos últimos anos tem-se observado um grande progresso em sua caracterização e na sua utilidade industrial e farmacêutica (BINDHU; SINGH, 2014).

Na literatura alguns artigos descrevem o efeito antidiarreico e antissecretório intestinal de fluidos laticíferos (KUMAR et al., 2001; GURGEL et al., 2002a; GURGEL et al., 2002b; TRADTRANTIP; NAMKUNG; VERKMAN, 2010; DAS et al., 2011) em modelos animais. Em um estudo realizado por Fernandes et al., (2015), o látex de *Plumeria pudica*, planta encontrada em abundância na cidade de Parnaíba-PI, foi alvo de fracionamento para estudos de caracterização bioquímica de proteínas, e análise de seu potencial anti-inflamatório e antinociceptivo em camundongos. Os resultados demonstraram um efeito benéfico significativo contra inflamação e dor.

A diarreia é caracterizada por uma disfunção ou distúrbio intestinal, que ocasiona um aumento no número de defecações, acompanhada por uma secreção aumentada e redução da absorção de líquidos, ocasionando um descompasso hidroeletrólítico no intestino (SCHILLER, 2012; WHYTE; JENKINS, 2012). Essa doença pode ser provocada por diferentes agentes, e vem sendo reconhecida como uma das principais causas de morte em todo o mundo, principalmente de bebês e crianças com idade inferior a 5 anos.

Estimativas apontam que mais de 2 milhões de pessoas morrem por ano no mundo de diarreia, independente da raça, sexo ou idade. (GERALD et al., 2007; GUTIERREZ et al., 2008; AWE et al., 2011; RAHMAN et al., 2013; ARAÚJO, et al., 2015). No Brasil, a mortalidade por doenças diarreicas em menores de cinco anos de idade é de aproximadamente 6,9%, sendo o Nordeste do país a porção territorial com maior número de óbitos, possivelmente relacionado com as condições sanitárias e socioculturais mais precárias (MORENO et al., 2010).

Apesar de se tratar de um grave problema de saúde pública, a diarreia não possui um tratamento farmacológico eficaz, e os que estão disponíveis apresentam inúmeros efeitos colaterais (AWE et al., 2011; ARAÚJO, et al., 2015). Na tentativa de sanar esse problema, a Organização Mundial da Saúde (OMS), juntamente com o Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF), iniciaram a um programa de controle das doenças diarreicas agudas, abordando práticas da medicina tradicional, incentivando o uso de medicamentos à base de plantas medicinais (WHO, 2004).

Com base nestes dados, e levando em consideração o potencial farmacológico de proteínas laticíferas, o presente estudo avaliou os efeitos do látex de *Plumeria pudica* no trânsito gastrointestinal, secreção intestinal e na motilidade intestinal, por meio de modelos animais de diarreia aguda induzida por óleo de rícino.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 PLANTAS PRODUTORAS DE LÁTEX

Látex é um fluido viscoso, que extravasa de algumas plantas em locais de ferimentos. Pode ser encontrado em mais de 20.000 espécies distribuídas em aproximadamente 40 famílias. As plantas produtoras de látex são também conhecidas como plantas laticíferas (LEWINSOHN, 1991; HUNTER, 1994).

O látex é um produto natural que apresenta significativo interesse científico e comercial. A presença desse material na composição de algumas espécies de plantas demonstra a sua importância biológica, embora sua diversidade e função na natureza ainda não sejam inteiramente compreendidas. Com base nos estudos realizados, não se pode afirmar que o látex desempenha algum papel metabólico. Possivelmente as plantas utilizam esse composto em resposta ao ataque de insetos, através de dois mecanismos de defesa distintos: bioquímicos e mecânicos (BAUER, 2013).

Células especializadas conhecidas como laticíferos armazenam o látex, e ao sofrerem alguma ruptura de forma mecânica ou por herbivoria iniciam um processo de coagulação para impedir a perda de nutrientes da planta. Além da vedação da ferida, o látex funciona como um sistema de defesa das plantas para a restauração das propriedades mecânicas das mesmas (BAUER, 2014).

Laticíferos foram definidos tradicionalmente como tipos de células secretoras que acumulam látex em seu citoplasma, como uma emulsão de micropartículas lipopoliméricas em conjunto com pequenas moléculas e proteínas. São díspares do conjunto de compostos intercelulares e materiais lipofílicos presentes nos dutos secretores e cavidades (FAHN, 1988).

Com base no modo de origem e o desenvolvimento, dois tipos gerais de laticíferos foram reconhecidos e nomeados de articulados e não articulados (CAI; LI; YIN, 2009). Laticíferos articulados são formados por cadeias de células unidas entre si, a partir da perfuração das paredes celulares de células próximas, produzindo um citoplasma multinucleado contínuo, podendo formar, às vezes, estruturas ramificadas, após a degradação de mais paredes celulares. Os laticíferos não articulados por sua vez originam-se de uma única célula, que se alonga durante o crescimento das plantas, e procede por meio de divisões nucleares sem citocinese,

resultando em células multinucleadas, que por vezes, podem se fundir de modo a formar uma rede ramificada que, em seguida, continua a aumentar concomitantemente com o crescimento da planta (HAGEL; YEUNG; FACCHINI, 2008).

Um exemplo de aplicação industrial pode ser visto na utilização do látex da *Hevea brasiliensis* (seringueira), uma árvore nativa do Brasil, para a produção de borracha natural, devido à alta qualidade, alto rendimento, fácil colheita e processamento (POST et al., 2012; TANG et al., 2013).

Outro exemplo de látex com muitas aplicações nas indústrias alimentícia e farmacêutica é o da planta laticífera *Carica papaya* (mamoeiro), rica fonte de endopeptidases cisteínicas, e outras enzimas, tais como enzimas quitinolíticas, glicosidase, glutaminil ciclotransferase e peroxidase (CHEN; CHUNG; CHANG, 2012).

### 2.1.1 Características físico-químicas do látex

O látex que flui de dentro dos laticíferos de plantas (raízes, caules, folhas e frutos), apresenta na maioria das vezes aspecto leitoso, podendo variar em coloração (branco, amarelo, vermelho ou incolor) e viscosidade dependendo da espécie. Tanto a viscosidade como a cor tipicamente branca do látex são devido a partículas de borracha dispersas no fluido (KONNO, 2011).

Evidências apresentadas em alguns estudos sugerem que a produção de látex em plantas é fenotipicamente sensível às condições ambientais. Isso foi verificado em um trabalho realizado com a borracha da seringueira (*Hevea brasiliensis*) e da batata-doce (*Ipomoea batatas*) em que, diferentes níveis de luz, aridez e as condições de umidade do solo, provocaram interferência na quantidade de produção de látex (DATA et al., 1996; RAJ et al., 2005).

Um dos principais componentes do látex é a borracha natural, constituído principalmente de cis-1,4-poli-isopreno, muito importante para as plantas, devido às suas propriedades físicas únicas, incluindo resiliência, elasticidade, resistência à abrasão e impacto, a eficiente dispersão de calor e maleabilidade em baixas temperaturas (CORNISH, 2001; AOKIA et al., 2014).

O látex ainda apresenta em sua composição alguns constituintes de baixo peso molecular como terpenóides, alcalóides tais como a morfina na espécie

*Papaver*, e compostos fenólicos. Também foram descritos como componentes do látex, proteínas com funções de defesa onde peptidases que pertencem a diferentes classes catalíticas desempenham um papel defensivo contra fitopatógenos, por exemplo, proteínas digestivas como as proteases de cisteína nas espécies de *Carica papaya* e *Ficus*, inibidores de proteinase, oxidases de polifenol, e lectinas (AGRAWAL; KONNO, 2009; KONNO, 2011). Muitos destes compostos estão relacionados à resistência contra o ataque de herbívoros, apresentando características tóxicas e antinutritivas (DUSSOURD; EISNER, 1987; DUSSOURD, 1995).

## 2.2 PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS DE PLANTAS PRODUTORAS DE LÁTEX

Estudos que se concentram na bioprospecção, caracterização e investigação de atividades biológicas relacionadas a compostos presentes no látex de plantas estão muito presentes na literatura científica, bem como sobre suas propriedades farmacológicas, tais como atividade anti-inflamatória (SILVA et al., 2010), analgésica (FERNANDES et al., 2015), antitumoral (OLIVEIRA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2010) e antiartríticas (SARATHA; SUBRAMANIAN, 2012).

O látex de *Himatanthus drasticus*, conhecido popularmente no Nordeste do Brasil como "janaguba", foi testado para suas propriedades anti-inflamatórias *in vivo* e *in vitro*, em modelos de inflamação. A atividade analgésica foi avaliada por meio do teste de formalina, onde o látex apresentou atividade analgésica inibindo tanto a fase neurogênica como a inflamatória. Os autores também demonstraram que o látex inibe significativamente edema da pata induzido por carragenina e dextrana, bem como a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida pela carragenina. O látex de *H. drasticus* mostrou expressiva inibição da mieloperoxidase (MPO) a partir de neutrófilos humanos estimulados, e diminuiu significativamente o número de células que expressam atividade de óxido nítrico-sintase induzida (iNOS) na pata dos ratos submetidos ao edema induzido por carragenina, sugerindo um envolvimento da droga com o sistema óxido nítrico (NO) (LUCETTI et al., 2010).

Em outro estudo realizado, Saratha e Subramanian (2012) demonstraram propriedades antiartríticas de compostos obtidos do látex de *Calotropis gigantínea* em um modelo de artrite induzida por adjuvante completo de Freund em ratos.

Em outros trabalhos, estudos foram desenvolvidos com uma fração rica em proteínas obtidas a partir do látex de *Calotropis procera*. Estes trabalhos demonstraram que esta fração apresentava atividade anti-inflamatória em diferentes modelos experimentais (ALENCAR et al., 2004), bem como analgésica (SOARES et al., 2005).

Esta mesma fração proteica obtida do látex de *C. procera* também foi demonstrada apresentar atividade citotóxica seletiva contra células tumorais humanas (OLIVEIRA et al., 2007). Neste estudo os autores demonstraram a origem proteica da atividade, uma vez que o tratamento térmico ou com enzima proteolítica promovia a perda da atividade. Em adição, considerável avanço no mecanismo de ação foi apresentado, onde a citotoxicidade foi demonstrada envolver vias de indução de morte por apoptose.

A partir dos resultados apresentados no estudo anterior, onde proteínas laticíferas (LP) de *C. procera* demonstraram ter efeitos citotóxicos, Oliveira et al., (2010) realizaram um trabalho com objetivo de determinar os efeitos antitumorais de proteínas do látex de *C. procera in vivo*, utilizando como modelo ratos transplantados com sarcoma 180. Neste estudo, a fração proteica reduziu de modo significativo o desenvolvimento do tumor quando comparado com a droga padrão (5-fluorouracil) e ainda promoveu um aumento na expectativa de vida dos animais.

Estudos desenvolvidos por Matos et al., 2013 demonstraram ainda a ação anti-inflamatória de proteínas obtidas do látex de *H. drasticus*. Neste trabalho a atividade anti-inflamatória era perdida quando a fração era submetida a tratamento térmico antes da administração nos animais, reforçando a natureza proteica das moléculas envolvidas no evento observado.

Estes estudos demonstram que proteínas presentes em fluidos laticíferos apresentam interessantes efeitos biológicos em diferentes modelos de farmacologia. Estes dados nos estimula a investigar as propriedades farmacológicas destas classes de moléculas em outros fluidos laticíferos, e suas possíveis atividades biológicas.

### 2.2.1 Potencial antidiarreico e antissecretório do látex de plantas

O potencial antidiarreico e antissecretório do látex de varias espécies de plantas foram testados (KUMAR et al., 2001; GURGEL et al., 2002a; GURGEL et al.,

2002b; TRADTRANTIP; NAMKUNG; VERKMAN, 2010; DAS et al., 2011; KUMAR; SURESH; KALAVATHY, 2013). Como exemplo, a atividade antidiarreica do látex de *Calotropis procera* (Asclepiadaceae), planta utilizada popularmente como medicinal, foi avaliado por Das et al., (2011). Utilizando extratos etanólicos do látex, o potencial antidiarreico foi estudado em modelos de diarreia induzida por óleo de rícino, em camundongos. Os resultados indicaram que os extratos etanólicos de *C. procera* possuem eficiente capacidade antidiarreica, podendo explicar dessa forma o uso da planta na medicina tradicional como antidiarreico.

Crofelemer, uma molécula polifenólica isolado a partir do látex da espécie de planta *Croton lechleri* da família Euphorbiaceae, foi avaliada em ensaios clínicos para diarreias secretoras de várias etiologias. A atividade antissecretória de crofelemer foi significativa para as diferentes etiologias estudadas, sendo demonstrado que sua ação possivelmente está envolvida com a inibição de dois canais de cloreto intestinais não relacionados estruturalmente (TRADTRANTIP; NAMKUNG; VERKMAN, 2010).

O látex íntegro de *Calotropis procera* (Asclepiadaceae), demonstrado por outros estudos como um potente agente anti-inflamatório, foi testado por Kumar et al., (2001) para sua atividade antidiarreica. Em modelo de diarreia induzida por óleo de rícino o látex dialisado de *C. procera* produziu uma diminuição significativa na frequência de defecação, na severidade da diarreia e um efeito protetor contra a diarreia em 80% dos ratos. Para a compreensão de seu mecanismo ligado a atividade antidiarreica, os pesquisadores avaliaram de maneira mais detalhada seu efeito sobre o trânsito intestinal, acumulação de fluido intestinal induzida por óleo de rícino (*enteropooling*) e a concentração de eletrólitos no fluido intestinal. O látex íntegro produziu uma diminuição significativa no trânsito intestinal, em comparação com um grupo de animais normais e outro tratado com óleo de rícino. Ao contrário da atropina, o látex de *C. procera* inibiu significativamente o *enteropooling* induzido por óleo de rícino. No entanto, foi observado que ele não altera as concentrações de eletrólitos no fluido intestinal, em comparação com ratos tratados com óleo de rícino.

A atividade antidiarreica e antissecretória intestinal do látex do *Croton urucurana* Baill. foi avaliada por meio de modelos animais de diarreia induzida por óleo de rícino e secreção intestinal induzida pela toxina da cólera. Esse estudo demonstrou que o látex apresenta atividade antidiarreica, admitindo seu uso na medicina popular. Os resultados também sugerem que o efeito apresentado

independe da participação de mecanismo nitriérgico ou opióide (GURGEL et al., 2002a).

Em estudo realizado por Gurgel et al., (2002b) foi analisado a atividade inibitória do látex do *Croton urucurana* Baill. sobre o trânsito gastrointestinal de camundongos, tentando elucidar as possíveis vias de ação envolvidos em sua atividade. Os ensaios biológicos foram feitos por meio de modelos de trânsito gastrointestinal normal e trânsito gastrointestinal estimulado por fisostigmina. As análises demonstraram um efeito inibitório significativo do látex no trânsito gastrointestinal de camundongos. Não foi evidenciado a participação de mecanismo opióide, colinérgico,  $\alpha_2$ -adrenérgico ou nitriérgico, na produção desse efeito, mesmo que o eventual mecanismo de ação envolvido não tenha sido esclarecido.

É importante mencionar que, nenhuma caracterização da natureza das moléculas envolvidas foi desenvolvido. Na presente proposta, os ensaios serão conduzidos com uma fração rica em proteínas obtida do látex de *P. pudica*.

### 2.2.2 O gênero *Plumeria* L. e a espécie *Plumeria pudica* (Jacq., 1760)

A presença de látex é uma das características mais marcantes das plantas pertencentes às famílias Asclepiadaceae, Apocyanaceae, Euphorbiaceae e Moraceae (YAGAMI et al., 1998; BINDHU; SINGH, 2014).

O gênero *Plumeria* pertence à família Apocynaceae e é nativo do continente americano. As plantas que compõem esse gênero são largamente cultivadas nas regiões tropicais e subtropicais de todo o planeta. Gênero *Plumeria* L (Apocynaceae), bem conhecido por árvores ou arbustos, é originária da América tropical e é encontrado desde regiões do sul do México até o norte da América do Sul, e é também abundantemente encontrada na Índia. São reconhecidas como excelentes plantas ornamentais, muitas vezes sendo vistas em cemitérios (TUNG, 1999; SHINDE; PATIL; BAIRAGI, 2014). As plantas do gênero *Plumeria* são famosas por sua beleza e flores perfumadas. Os óleos essenciais das flores são usados para alguns fins, como na aromaterapia e perfumaria (SHAIDA et al., 2008; SHINDE; PATIL; BAIRAGI, 2014).

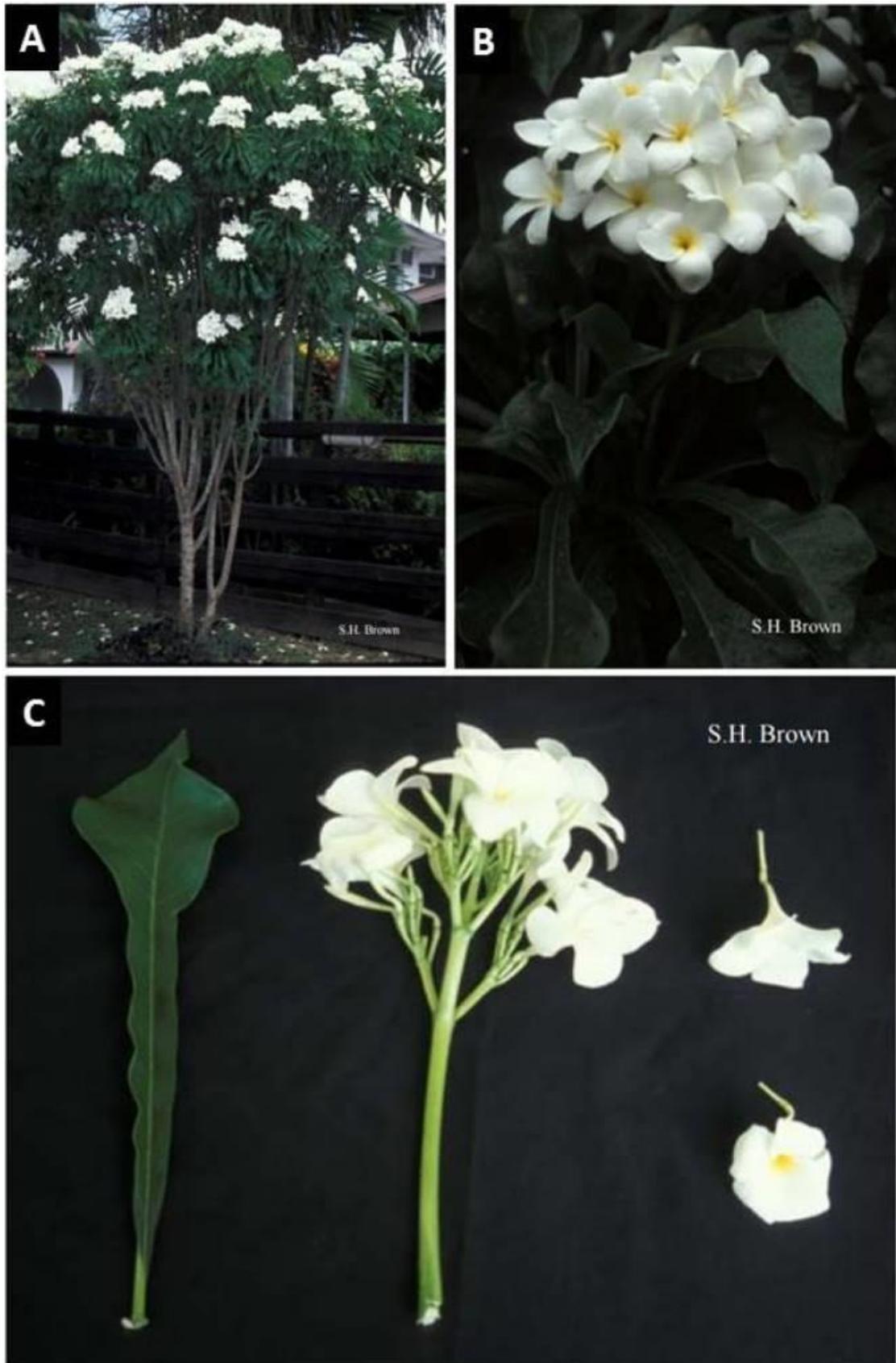
Várias espécies deste gênero também são conhecidas por sua importância medicinal. Suas propriedades medicinais são muitas vezes relacionadas a seu látex que se apresenta frequentemente como enérgico e corrosivo. Algumas espécies

como *P. accuminata*, *P. alba*, *P. rubra*, *P. lancifolia*, *P. phagidenica* e *P. drastic* são comumente utilizadas como medicinais, sendo muito empregadas na medicina tradicional (CHOUDHARY; KUMAR; SINGH, 2014).

As espécies do gênero *Plumeria* apresentam grande diversidade fitoquímica, e na Índia, onde os habitantes ainda fazem o uso de muitos fitoterápicos, essas plantas são utilizadas para vários fins terapêuticos como antidiarreico, tosse, febre, coceira, reumatismo, asma, gonorreia, doenças do sangue, sangramentos e tumores (DEVPRAKASH et al., 2012).

Popularmente conhecida como “buquê de noiva”, pela disposição anatômica de suas flores, a *P. pudica* é uma planta de folhas simples, com pecíolo curto e um par de lobos perto da ponta aguda (Figura 1). Suas flores são de cor branca com uma fauce amarela e, não possuem fragrância, diferindo nessa última característica das outras espécies de seu gênero. Os frutos são do tipo vagem, e comumente estão arranjados em pares. Uma característica dessa espécie é que elas perdem suas folhas, em períodos de estiagem prolongada ou durante invernos muito rigorosos (decíduas ou caducas) (BROWN, 2013).

Recentemente, um estudo foi realizado com uma fração rica em proteínas obtidas a partir do látex de *P. pudica*. Neste estudo o látex foi fracionado para estudos de caracterização bioquímica de proteínas, e análise de seu potencial anti-inflamatório e antinociceptivo em modelos animais. Os resultados obtidos demonstraram que proteínas do látex foram capazes de inibir o edema de pata induzido por carragenina, dextrana, serotonina, histamina, e prostaglandina E<sub>2</sub>. A inibição da inflamação induzida por carragenina foi acompanhada de redução da produção de mieloperoxidase na pata dos animais. A fração proteica ainda inibiu a migração de neutrófilos para cavidade peritoneal de animais no modelo de peritonite em um evento acompanhado pela inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias. Em adição, proteínas de *P. pudica* inibiram as contorções abdominais induzidas por ácido acético e o tempo de lambertura da pata na segunda fase do teste de formalina. Neste estudo ficou demonstrado que as atividades observadas eram promovidas por proteínas uma vez que a atividade biológica investigada era abolida quando a fração proteica era submetida à desnaturação térmica antes da administração nos animais. Estes resultados demonstram o potencial farmacológico de proteínas presentes no látex desta espécie, nos estimula a investigar outras potencialidades para o material (FERNANDES et al., 2015).



**Figura 1.** Planta *Plumeria pudica*. A – Aspecto geral da espécie; B – Disposição anatômica de suas flores em forma de “buquê de noiva”; C – Morfologia da folha e flor. Fotos: A, B e C – Stephen H. Brown.

## 2.3 DIARREIA

Fezes diarreicas são aquelas que tomam a forma do recipiente onde são depositadas, descritas frequentemente como moles ou líquidas. Algumas pessoas consideram diarreia como um aumento no número de evacuações, mas a consistência das fezes é realmente a característica principal (OCHOA; SURAWICZ, 2012). Dessa maneira, segundo a OMS, diarreia é o trânsito acelerado do conteúdo gastrointestinal pelo intestino, provocando uma elevação no número de evacuações, e aumento na fluidez das fezes, com ou sem a presença de muco e sangue (WHYTE, 2012).

Os sintomas associados à fase aguda desse tipo de enfermidade incluem febre, cólica abdominal, náuseas, vômitos, fadiga dentre outros. Já a diarreia crônica pode ser acompanhada por um quadro de perda de peso, desnutrição, dor abdominal ou outros sintomas subordinados a doença (OCHOA; SURAWICZ, 2012).

### 2.3.1 Epidemiologia das doenças diarreicas

Doenças diarreicas são a segunda principal causa de mortalidade infantil em todo o mundo, perdendo apenas para a pneumonia. Em 2010, a diarreia foi responsável por 800 mil mortes de crianças com idade inferior a cinco anos, respondendo por 10,5% de todas as mortes dentro dessa faixa etária (LIU, 2012).

Segundo o Relatório de Progresso 2013 sobre o Compromisso com a Sobrevivência Infantil: Uma Promessa Renovada, do Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF), a diarreia levou a óbito em média mais de 1.600 crianças menores de cinco anos de idade por dia, em todo o mundo no ano de 2012. O mesmo estudo aponta esse tipo de agravo como o responsável por 9% de todas as mortes de menores de cinco anos, deixando um saldo negativo de mais 580 mil crianças mortas em 2012 (UNICEF et al., 2013).

Os padrões de mortalidade e morbidade diferem entre as regiões geográficas, com 78% de todas as mortes por diarreia pediátrica ocorridas em regiões do continente Africano e Sudeste Asiático, segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) (BOSCHI-PINTO; VELEBIT; SHIBUYA, 2008). No Brasil os índices de mortalidade infantil ocasionados por diarreia aguda aproximam-se de 8 para cada 100.000 crianças (MORENO 2010).

A morte em sua maioria ocorre no estágio agudo da doença, em decorrência principalmente da desidratação, agravada pela concomitante desnutrição (MORENO et al., 2010). A maioria destas mortes ocorre entre crianças menores de dois anos. As causas mais comuns da diarreia são as infecções do trato intestinal, normalmente causada por agentes virais (UNICEF et al., 2013).

A principal rota de transmissão desse tipo de infecção é a oral-fecal, podendo acontecer através da ingestão de alimentos contaminados e fluidos, ou pelo próprio contato direto de pessoa-a-pessoa, sendo este último de grande importância, pois mesmo o contato com pequenas doses infecciosas (bactérias ou toxinas) são suficientes para ter início uma infecção, por exemplo, por shigelose ou cólera. Os alimentos, a água e o próprio homem, são as principais fontes reservatórias de enteropatógenos humanos. Alguns animais acabam também servindo como reservatórios para certos agentes infecciosos humanos, e dessa forma tem-se origem condições conhecidas como zoonoses (PATEL; THILLAINAYAGAM, 2011; KELLY, 2011).

Mesmo existindo intervenções eficazes para o combate a diarreia, muitas crianças ainda estão morrendo, provavelmente pela baixa disponibilidade ou acessibilidade a essas intervenções. Sendo assim, uma melhor distribuição de vacinas e remédios, incluindo sais de reidratação oral e zinco, bem como medidas preventivas, incluindo a água potável e saneamento básico melhorado, são essenciais para o combate a essa doença (UNICEF et al., 2013).

### 2.3.2 Fisiopatologia das doenças diarreicas

Os processos de absorção e secreção de água e eletrólitos no interior do intestino acontecem de maneira balanceada, de tal modo que quando ocorre um desequilíbrio nesse sistema, a consequência é o surgimento da diarreia. De maneira geral, a diarreia pode ser dividida em secretora ou osmótica (WHYTE, 2012).

A diarreia secretora tem como característica um aumento na produção de fluido pela mucosa intestinal, de tal forma que a capacidade de reabsorção do intestino tornar-se bastante prejudicada. Os indivíduos acometidos com esse quadro patológico tipicamente apresentam um volume de fezes muito aumentado, podendo chegar a mais de um litro por dia, com pH neutro e sem alteração na quantidade de fezes produzida em jejum (DOUGHTY, 2012).

As causas mais comuns da diarreia secretora são as infecções por agentes infecciosos, mas considera-se que qualquer substância que tenha a capacidade de provocar o desequilíbrio entre secreção e absorção intestinal pode ser considerada um agente causador (STRASINGER; DI LORENZO, 2008).

Alguns patógenos infecciosos como o *Vibrio cholerae*, *Camylobacter jejuni*, *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, e *Clostridium difficile* secretam substâncias tóxicas que se ligam com as estruturas intestinais internas, alterando, por vezes de forma irreversível, a quantidade de fluido que é expelido para o lúmen do intestino. Como um exemplo, a toxina da cólera excretada por seu agente patogênico (*Vibrio cholerae*) causa diarreia secretora em massa, que durante a sua fase aguda, pode ocasionar a produção de um litro de fezes por hora (FARTHING, 2006).

Agentes não infecciosos que podem provocar o surgimento de diarreia secretora incluem substâncias químicas produzidas por certos tipos de câncer, prostaglandinas produzidas em pacientes com inflamação do intestino e substâncias de difícil absorção como os ácidos biliares e ácidos graxos (DOUGHTY, 2012).

A diarreia osmótica ocorre quando existe uma disfunção na capacidade do intestino em reabsorver o fluido à medida que este flui através do lúmen (KENT; BANKS, 2010). Isto pode ser ocasionado pela incompleta ou má absorção de nutrientes no intestino delgado, permitindo que uma massa fecal maior e mais líquida percorra entre os dois pontos do intestino (STRASINGER; DI LORENZO, 2008). Este material fecal, em seguida, cria um gradiente osmótico negativo, e dessa forma provoca uma fuga de mais fluido para dentro do intestino aumentando o volume de fezes (POWELL; JENKINS, 2012). Uma pessoa com diarreia osmótica terá o volume das fezes de aproximadamente um litro por dia, e estas apresentam característica ácida, com maior perda de potássio do que de sódio (DOUGHTY, 2012).

Esse tipo de diarreia pode ser provocado por diferentes causas, como a disponibilidade enzimática diminuída (intolerância à lactose), uma anomalia genética que diminui ou elimina a capacidade do corpo para absorver certos nutrientes (doença celíaca), açúcares que são fracamente absorvidos (sorbitol, manitol ou lactose), laxantes, antiácidos contendo magnésio, amebíase e administração de antibióticos, (STRASINGER; DI LORENZO, 2008), bem como má absorção de certas gorduras (DOUGHTY, 2012).

Outras causas que podem acarretar o surgimento de diarreia osmótica estão ligadas a mudanças dentro do intestino, que tendem a diminuir a capacidade de reabsorção de fluidos e nutrientes e estes acabam por evadir-se através do lúmen. A desnutrição, especialmente a desnutrição proteico-calórica, provoca uma “atrofia reversível das vilosidades e escova-fronteira” (POWELL; JENKINS, 2012), estruturas intestinais responsáveis pela absorção. A ressecção de partes do intestino, especialmente no íleo terminal, diminui mecanicamente a capacidade de absorção, devido à diminuição do intestino disponível e conseqüente diminuição do tempo de trânsito intestinal (DOUGHTY, 2012). Inflamação do intestino devido a processos de infecção ou doença (doença de Crohn) podem ser outras causas de diarreia osmótica (POWELL; JENKINS, 2012).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito antidiarreico das proteínas do látex de *Plumeria pudica* em camundongos, utilizando modelo de diarreia induzida por óleo de rícino.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade antidiarreica de uma fração proteica PL solúvel em água do látex de *P. pudica* em modelo de diarreia aguda induzida por óleo de rícino.
- Avaliar o efeito inibitório de PL no trânsito e na motilidade (contrações) gastrointestinal.
- Avaliar o efeito de PL no *enteropooling* induzido por óleo de rícino em camundongos.
- Avaliar um possível efeito protetor de PL sobre a mucosa intestinal na diarreia aguda induzida por óleo de rícino, realizando dosagens de glutathiona reduzida (GSH) e concentração de malondialdeído (MDA), marcadores de estresse oxidativo.
- Investigar se proteases cisteínicas endógenas participam da ação antidiarreica de PL.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 COLETA E FRACIONAMENTO DO LÁTEX DE *Plumeria pudica*

A espécie foi identificada e sua exsicata depositada no Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará sob o número de depósito N° 52549. As coletas foram realizadas na cidade de Parnaíba-PI. A coleta e processamento do material foram realizados segundo metodologia descrita por Oliveira (2011) e descrita a seguir.

Para a obtenção do látex de *Plumeria pudica* foram feitos cortes de galhos da planta. Para minimizar o efeito natural de coagulação do látex, o exsudado (10mL de látex) foi coletado em tubos do tipo Falcon contendo 10mL de água destilada (1:1 v/v). No laboratório o material proveniente da coleta foi centrifugado por um período de 15 minutos a 3600rpm, para separação das fases sólida (borracha) e líquida (soro) do látex. O sobrenadante resultante deste processo foi transferido para uma membrana de diálise com capacidade para retenção de partículas com massa molecular superior a 8.000Da, e o precipitado obtido após a centrifugação do material foi desprezado.

O material foi submetido à diálise contra água destilada (1:20 v/v) durante 48 horas, com trocas periódicas de água a cada 6 horas. Em seguida, o conteúdo da membrana passou por uma nova centrifugação, sob as mesmas condições acima descritas, e o sobrenadante obtido denominado de proteínas do látex de *Plumeria pudica* (PL). Este material foi então liofilizado e utilizado em todos os ensaios.

### 4.2 TRATAMENTO DE PL COM CALOR

Para evidenciar a natureza proteica da atividade biológica investigada, a fração PL foi dissolvida em solução salina 0,9% e aquecida a 100°C por 30 minutos. O aquecimento foi realizado com o intuito de desnaturar as proteínas da fração.

### 4.3 TRATAMENTO QUÍMICO DE PL

Uma coleta independente foi realizada na presença de um inibidor de protease cisteínica, iodoacetamida (IAA 3mM), e seguida dos mesmos

procedimentos descritos acima. Esta coleta originou uma fração proteica (PL+IAA) que foi utilizada para investigar o possível envolvimento de proteases cisteínicas contidas no látex nas atividades biológicas testadas.

#### 4.4 ELETROFORESE (SDS-PAGE)

A análise do perfil proteico de PL e tratamentos (PL100°C e PL+IAA) foram examinadas por eletroforese SDS-PAGE. O método descrito por Laemmili (1970), adaptado para o uso de géis de separação em placas, foi utilizado. O gel de aplicação, contendo 5% de poliacrilamida foi montado utilizando tampão Tris-HCl 0,5M (pH 6,8) contendo 10% de dodecil sulfato de sódio (SDS). O gel de separação contendo 12,5% de poliacrilamida foi montado em uma solução tampão Tris-HCl 3M (pH 8,8) contendo 10% de SDS. As frações foram dissolvidas em 1ml de tampão Tris-HCl 0,0625M (pH 6,8) contendo 2% de SDS e 5% de 2-mercaptoetanol, e incubadas a 100°C durante cinco minutos. Depois de resfriadas, as amostras foram centrifugadas a 5.000 x g, 25°C, e ao sobrenadante obtido foram adicionados 3µl de azul de bromofenol e cristais de sacarose. Em seguida, as amostra foram aplicadas no interior dos poços do gel de concentração. A corrida eletroforética foi realizada a uma voltagem constante de 100V e 25mA por placa à temperatura ambiente, utilizando Tris-HCl 0,025M pH 8,3, contendo 0,192M de glicina e 0,1% de SDS, como tampão de corrida. Após corrido a eletroforese, os géis foram corados com uma solução de azul brilhante de Coomassie R-350 0,1% solubilizado em água: ácido acético: metanol (8:1:3,5 v/v/v) durante 4 horas e depois descorados com a mesma solução na ausência do corante, permitindo assim a visualização das bandas proteicas.

#### 4.5 ENSAIOS BIOLÓGICOS

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos Swiss (*Mus musculus*), fêmeas ou machos, adultos, com peso variando entre 22 a 28g, fornecidos pelo Biotério da Universidade Federal do Ceará (UFC) e pelo Biotério da Universidade Federal do Piauí (UFPI). Os animais foram acondicionados em gaiolas metabólicas, em um ambiente com temperatura (22 ± 2°C) e luminosidade controladas em um ciclo de 12h claro/12h escuro, com livre acesso a água e ração

padrão *ad libitum*. Para a realização dos experimentos os animais precisaram ser privados de alimentação por um período de 18 a 20 horas anterior ao procedimento, mas com livre acesso a água. Os protocolos experimentais consistiram de 5 a 8 animais por grupo.

#### 4.5.1 Critérios éticos

Este trabalho seguiu os princípios e normas internacionalmente aceitas para utilização de animais em projetos de pesquisa e do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal). Os procedimentos cirúrgicos foram realizados de acordo com a Lei Federal 11.794 (outubro de 2008) ditada pela Sociedade Brasileira de Ciências de Animais de Laboratório. O presente projeto foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Piauí (Protocolo nº 037/15) (ANEXO I).

#### 4.5.2 Atividade das Proteínas do Látex de *Plumeria pudica* (PL) no modelo de diarreia induzida por óleo de rícino em camundongos: curva dose-resposta

O Modelo de diarreia induzida por óleo de rícino foi realizado de acordo com o método descrito por Mascolo et al., (1994) com algumas modificações. Os camundongos foram divididos em grupos e pré-tratados com a PL (10, 20, 40mg/kg, *i.p.*), PL 100°C (40mg/kg, *i.p.*), PL + IAA (40mg/kg, *i.p.*) ou loperamida (IMOSEC®, Cloridrato de loperamida, 2mg, Jansen-Cilag Farmacêutica LTDA) (5mg/kg, *v.o.*), droga utilizada no tratamento da diarreia.

A diarreia foi induzida pela administração do óleo de rícino (10ml/kg, *v.o.*) 60 minutos após o pré-tratamento. Os grupos controles receberam apenas o veículo (salina 0,9%, 2,5ml/kg, *i.p.*) ou veículo + óleo de rícino. Imediatamente após a administração do óleo de rícino os camundongos foram colocados em caixas forradas com papel absorvente e observados durante 3 horas, por um observador alheio ao tratamento dos grupos, para a presença de diarreia definida como a presença de fezes mal formadas de aspecto úmido/fluido na porção proximal da cauda do animal onde será atribuído a cada camundongo um escore de sujidade de 0 a 3 onde: 0 = ausência de diarreia; 1 = eliminação de fezes de aspecto úmido; 2 =

eliminação de fezes de aspecto pastoso em pequena/moderada quantidade e 3 = eliminação de fezes de aspecto fluido ou pastoso em grande quantidade.

Além dos escores, foi registrada a quantidade de fezes, em miligramas, eliminada por cada grupo. O resultado observado no grupo controle que recebeu óleo de rícino foi considerado como 100% de diarreia. A atividade antidiarreica dos grupos testes foi expressa como a porcentagem de inibição da defecação e porcentagem de inibição da diarreia, e calculada da seguinte forma:

$$\% \text{ Inibição de defecação/diarreia} = [(A-B) / A] \times 100$$

Onde A indica a média de defecação ou de fezes úmidas/fluidas causada pelo óleo de rícino; e B indica a média de defecação ou de fezes úmidas/fluidas nos grupos testes que receberam diferentes doses de PL, PL submetidos a diferentes tratamentos (PL + IAA, PL 100°C) ou loperamida.

#### 4.5.3 Atividade das Proteínas do Látex de *Plumeria pudica* (PL) no *enteropooling* induzido por óleo de rícino em camundongos

O modelo de *enteropooling* induzido por óleo de rícino foi realizado de acordo com o método de Robert et al., (1976) com algumas modificações. Os animais foram mantidos em jejum por um período 18 horas antes do ensaio. Inicialmente os camundongos foram divididos em cinco grupos de 6 a 8 animais e pré-tratados com PL (40mg/kg, *i.p.*), PL 100°C (40mg/kg, *i.p.*), PL + IAA (40mg/kg, *i.p.*) ou loperamida (5mg/kg, *v.o.*). O *enteropooling* foi induzido pela administração de óleo de rícino (10ml/kg, *v.o.*) 60 minutos após o pré-tratamento. Os grupos controles receberam apenas o veículo (salina 0,9%, 2,5ml/kg, *v.o.*) ou veículo + óleo de rícino. Após o período de 3h os camundongos foram sacrificados e o intestino delgado foi isolado do piloro ao ceco. Em seguida, o intestino foi esvaziado com o auxílio de pinças e o volume de secreção intestinal foi mensurado em tubo graduado. Amostras de intestino do duodeno, jejuno e íleo foram coletadas e congeladas a -80°C para posterior avaliação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) e concentração de malondialdeído (MDA).

#### 4.5.4 Efeito das Proteínas do Látex de *Plumeria pudica* (PL) sobre o trânsito gastrointestinal: Modelo de trânsito gastrointestinal em camundongos

O efeito da PL sobre o trânsito gastrointestinal foi avaliado pelo método descrito por Dicarlo et al., (1994), utilizando uma suspensão de carvão ativado como marcador. Antes do teste, os animais foram privados de alimentos por um período de 18 horas com livre acesso a água. Os camundongos foram divididos em grupos e todos receberam óleo de rícino (10ml/kg, *v.o.*) e após trinta minutos, os grupos foram tratados com a PL (40mg/kg, *i.p.*) ou loperamida (5mg/kg, *v.o.*) ou salina (0,9%, 2,5ml/kg, *v.o.*). Uma hora após o tratamento todos os animais receberam 0,2ml de solução de carvão ativado (suspensão a 10% de carvão em 5% de goma arábica) oralmente. Vinte minutos mais tarde, todos os animais foram sacrificados, o intestino delgado foi removido e a distância percorrida pelo carvão ativado do piloro ao ceco foi medida e expressa como porcentagem de distância percorrida.

## 4.6 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

### 4.6.1 Determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) na mucosa intestinal

A concentração de glutathiona reduzida (GSH) foi determinada de acordo com o método proposto por Sedlak e Lindsay (1968). A determinação da glutathiona reduzida baseia-se na reação do DTNB [5,5 ditidio-bis-(ácido-2-nitrobenzóico)], com o tiol livre originando um dissulfeto misto mais ácido, o ácido 2-nitro-5-benzóico. Amostras de tecido da mucosa intestinal correspondentes ao duodeno, jejuno e íleo foram homogeneizadas em EDTA 0,02M para consequente preparação de um homogenato a 10%. A seguir, alíquotas de 400µl do homogenato foram adicionadas a 320µl de água destilada e a 80µl de ácido tricloroacético (TCA) a 50%. Em seguida o material passou por centrifugação a 3000rpm por 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação, 400µl do sobrenadante foi retirado e misturado a 800µl de tampão Tris 0,4M (pH 8,9) e 20µl de DTNB (reagente de Ellman) 0,01M. A mistura foi por fim agitada por 3 minutos e a absorbância mensurada a 412nm em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em µg de GSH/g de tecido.

#### 4.6.2 Determinação dos níveis de malondialdeído (MDA) na mucosa intestinal

A dosagem dos níveis de malondialdeído na mucosa intestinal foi determinada pelo método de Mihara e Uchiyama (1978). Amostras de tecido da mucosa intestinal correspondentes ao duodeno, jejuno e íleo foram homogeneizadas em KCl gelado 1,15% para preparar um homogenato a 10%. Na sequência, alíquotas de 250µl do homogenato foram adicionadas a tubos contendo 1,5ml de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> a 1% e 500µl de uma solução de ácido tiobarbitúrico aquoso (0,6%). Posteriormente, os tubos foram aquecidos, por um período de 45 minutos, em um banho de água a 100°C e a mistura reacional foi, então, resfriada em um banho de água gelada, seguida da adição de 4ml de n-butanol. Após a adição de n-butanol, as amostras foram agitadas em um misturador “vortex” por um minuto, e posteriormente centrifugados a 1500rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi mensurado a uma absorvância de 520 e 535nm, sendo o resultado obtido pela diferença da absorvância nas duas leituras. Os resultados foram expressos em nmol/g de tecido intestinal.

#### 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram feitas utilizando o programa GraphPad Prisma 5.0 e os resultados foram expressos como média ± E.P.M. O teste de análise de variância (ANOVA) seguido de correção por teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls ou teste t de Student foi utilizado para comparar os grupos. O teste de Kruskal-Wallis seguido por teste de comparação múltipla de Dunn's foi utilizado para comparar as medianas quando as medições não paramétricas foram necessárias. A diferença estatística foi considerada significativa quando  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

A capacidade de proteínas do látex de *Plumeria pudica* (PL) reduzir o número de fezes totais e diarreicas em camundongos tratados com óleo de rícino é mostrada na Tabela 1. As diferentes doses da fração PL (10, 20 e 40mg/kg, *i.p.*) reduziram a quantidade de fezes totais e diarreicas de modo significativo quando comparada com animais do grupo controle que receberam óleo de rícino (10mg/kg, *v.o.*) e não receberam nenhum tipo de tratamento ( $p < 0,05$ ). Os maiores valores de inibição foram obtidos quando os animais foram pré-tratados com PL na dose de 40 mg/kg. Com base nisto, esta dose foi utilizada nos demais ensaios biológicos realizados. O grupo controle loperamida (LOP 5ml/kg, *v.o.*) também inibiu de maneira significativa ( $p < 0,05$ ) a quantidade de fezes totais e diarreicas.

**Tabela 1.** Efeito das proteínas do látex na diarreia aguda induzida por óleo de rícino.

Tratamento	Dose	Fezes Totais (g)	Inibição da Defecação (%)	Fezes Diarreicas (g)	Inibição da Diarreia (%)
Óleo de rícino	10ml/kg	3,90±0,02	0,0	2,63±0,02	0,0
PL 10	10mg/kg	1,90±0,01*	51,50	1,81±0,02*	31,18
PL 20	20mg/kg	1,81±0,02*	53,59	1,50±0,02*	42,97
PL 40	40mg/kg	1,15±0,02*	70,51	1,06±0,02*	59,70
LOP	5mg/kg	0,98±0,01*	74,87	0,71±0,02*	73,00

Os valores foram dados como a média ± E.P.M. (n = 5), analisados por ANOVA seguido do teste de Newman Keuls ( $p < 0,05$ ). \*Percentual de inibição de fezes diarreicas, comparado com o grupo controle óleo de Rícino.

Proteínas do látex (PL) foram submetidas a tratamento químico e físico e em seguida testadas quanto à manutenção da capacidade de inibir as fezes diarreicas nos animais (Tabela 2). Após tratamento térmico (PL 100°C) perdeu a capacidade de inibir a quantidade de fezes totais e diarreicas quando comparada com animais do grupo controle óleo de rícino (10ml/kg, *v.o.*). Já a fração coletada na presença de iodoacetamida (PL+IAA) foi eficaz em reduzir a quantidade de fezes totais e diarreicas quando comparada com o grupo controle óleo de rícino ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 2.** Efeito de proteínas do látex submetidas a tratamento químico e físico na diarreia aguda induzida por óleo de rícino.

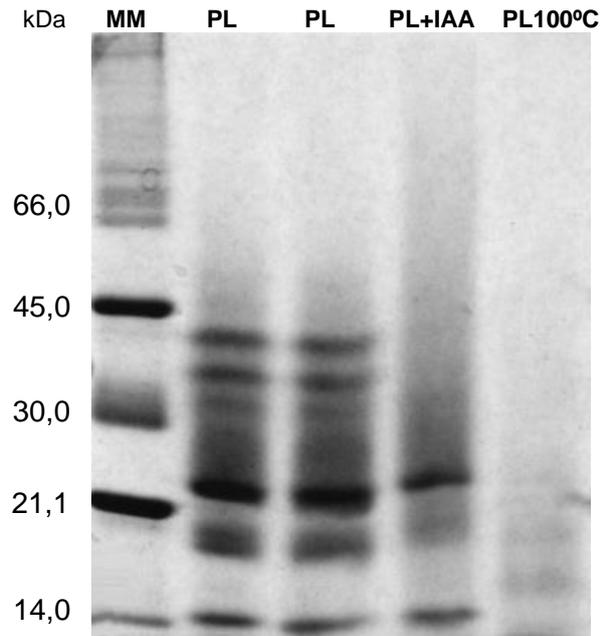
Tratamento	Dose	Fezes Totais (g)	Inibição da Defecação (%)	Fezes Diarreicas (g)	Inibição da Diarreia (%)
Óleo de rícino	10ml/kg	2,99±0,07	0	1,86±0,02	0
PL 100°C	40mg/kg	2,12±0,02	29,10	1,92±0,02	0
PL + IAA	40mg/kg	1,25±0,02*	58,19	1,11±0,02*	40,32

Os valores foram dados como a média  $\pm$  E.P.M. (n = 5), analisados por ANOVA seguido do teste de Newman Keuls ( $p < 0,05$ ). \*Percentual de inibição de fezes diarreicas, comparado com o grupo controle óleo de Rícino.

Com o objetivo de buscar uma correlação entre a atividade antidiarreica descrita anteriormente e o perfil proteico de PL após os tratamentos químico e físico, foi feita uma eletroforese em gel de poliacrilamida (Figura 2).

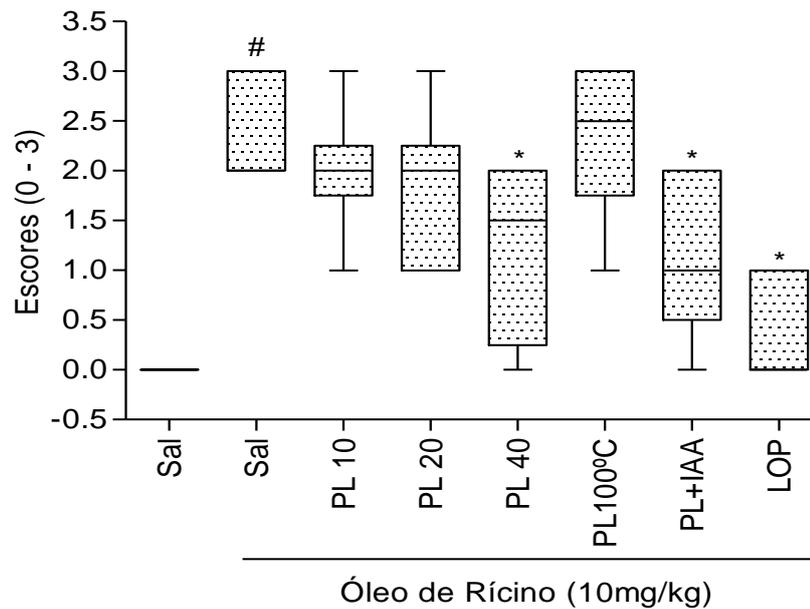
Observou-se uma mudança no padrão de bandas da fração proteica do látex coletado na presença do inibidor de protease IAA. No entanto, a mudança observada não provocou interferência na ação antidiarreica, pois PL+IAA continuou inibindo a defecação nos camundongos. A coleta realizada na presença de IAA foi capaz modificar o padrão de bandas correspondentes a proteínas com massa molecular entre 30,0 e 45,0kDa. Correlacionando este resultado com os anteriores, é possível sugerir que a atividade antidiarreica pode estar sendo exercida por proteínas com massa molecular igual ou inferior a 22,0kDa, e que provavelmente a atividade antidiarreica não está envolvida com a ação de proteases cisteínicas.

Foi possível observar que após tratamento térmico o conteúdo proteico da fração sofreu uma significativa redução, contudo, ainda foi possível observar bandas fracamente coradas. Tal resultado pode explicar o fato de PL ter perdido a ação antidiarreica após o tratamento térmico, no ensaio de atividade antidiarreica induzida por óleo de rícino onde.



**Figura 2.** Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) de proteínas solúveis do látex de *P. pudica* (PL) e tratamentos (PL+ IAA e PL 100°C). Marcadores de massa molecular (MM): albumina (66,0 kDa); ovalbumina (45,0kDa); anidrase carbônica (30,0kDa); inibidor de tripsina (20,1kDa) e lactalbumina (14,4kDa).

Além da análise de inibição de fezes diarreicas, foram avaliados os efeitos de PL sobre a fluidez das fezes na diarreia induzida por óleo de rícino em camundongos (Figura 3). Três horas após a indução por óleo de rícino, o grupo de animais controle produziu fezes diarreicas abundantes. O pré-tratamento dos animais com PL nas doses de 10 e 20mg/kg, *i.p.* ou PL 100°C (40mg/kg, *i.p.*) não apresentaram diferença estatística nos valores de escore quando comparados com o controle salina que recebeu óleo de rícino. Animais pré-tratados com PL 40mg/kg, *i.p.* e PL+IAA (40mg/kg, *i.p.*), reduziram a gravidade da diarreia e diminuíram a defecação de fezes diarreicas, quando comparados com o controle que recebeu óleo de rícino. Como esperado, loperamida (5mg/kg, *v.o.*) diminuiu a produção de fezes diarreicas significativamente.



**Figura 3.** Efeitos de PL sobre a fluidez das fezes na diarreia induzida por óleo de rícino através de escores do grau de sujidade na porção proximal da calda em camundongos. Os dados são apresentados como mediana de mínimo/máximo alcance. #  $p < 0,01$  vs. grupo salina sem óleo de rícino; \* $p < 0,05$  vs. grupo salina + óleo de rícino. Não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn foi usado para as comparações múltiplas. Abreviaturas: PL: proteínas do látex; Sal: salina; LOP: loperamida; IAA: iodoacetamida.

O teste de acúmulo do fluido intestinal induzido pelo óleo rícino (*enteropooling*) foi empregado para avaliar a relação entre as quantidades de fluido intestinal gerado pelo processo diarreico. O tratamento com PL (40mg/kg, *i.p.*), melhor dose observada nos experimentos anteriores, reduziu significativamente (31,42%) o volume do conteúdo intestinal quando comparado com o grupo controle que recebeu apenas óleo de rícino e solução salina. Loperamida reduziu o volume de fluido por 40% (Tabela 3).

**Tabela 3.** Efeitos de proteínas do látex sobre o acúmulo do fluido intestinal induzido pelo óleo rícino (*enteropooling*) em camundongos.

Tratamento	Dose	Fluido intestinal ( $\mu$ l)	Inibição (%)
Óleo de rícino	10ml/kg	0,35 $\pm$ 0,02	0
PL 40	40mg/kg	0,24 $\pm$ 0,03*	31,42
LOP	5mg/kg	0,21 $\pm$ 0,02*	40,0

Os valores são apresentados como médias  $\pm$  E.P.M. Número de animais/grupo 6-8.

\* $P < 0,05$  indica diferença significativa comparada com o grupo controle óleo de rícino. Analisados por ANOVA seguido do teste de Newman Keuls ( $p < 0,05$ ).

No entanto PL 100°C (40mg/kg, *i.p.*) e PL+IAA (40mg/kg, *i.p.*) não reduziram de maneira significativa o volume de fluido intestinal em relação ao tratamento controle (Tabela 4).

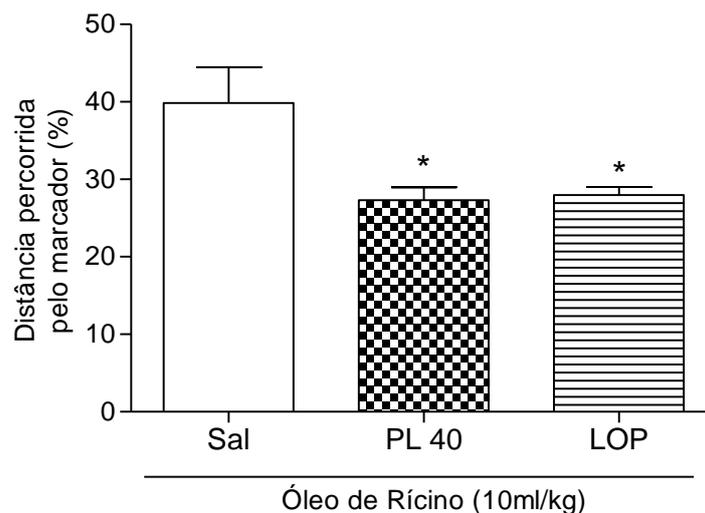
**Tabela 4.** Efeitos de proteínas do látex submetidas a diferentes tratamentos sobre o acúmulo do fluido intestinal induzido pelo óleo de rícino (*enteropooling*) em camundongos.

Tratamento	Dose	Fluido intestinal ( $\mu$ l)	Inibição (%)
Óleo de Rícino	10ml/kg	0,97 $\pm$ 0,09	0
PL 100°C	40mg/kg	0,83 $\pm$ 0,12	14,43
PL + IAA	40mg/kg	0,74 $\pm$ 0,11	23,71

Os valores são apresentados como médias  $\pm$  E.P.M. Número de animais/grupo 6-8.

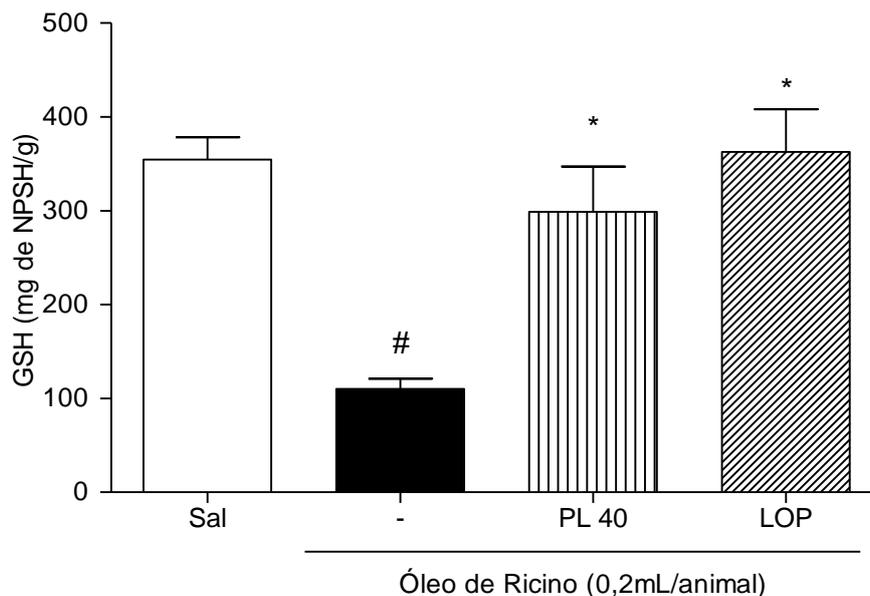
Não foram observadas diferenças significativas. Analisados por ANOVA seguido do teste de Newman Keuls ( $p < 0,05$ ).

Ao avaliar o efeito de PL (40mg/kg, *i.p.*) sobre o trânsito gastrointestinal em camundongos, foi visto que o mesmo reduziu significativamente ( $P < 0,05$ ) o movimento de propulsão e o trânsito do marcador (carvão ativado) através do intestino delgado em comparação com o grupo controle salina que recebeu o agente indutor óleo de rícino (10ml/kg, *v.o.*). O grupo tratado com loperamida (LOP 5mg/kg, *v.o.*) teve um efeito análogo ao grupo tratado com PL (40mg/kg, *i.p.*) quando comparado ao controle positivo (Figura 4).



**Figura 4.** Efeito de PL (40mg/kg, *i.p.*) sobre o trânsito gastrointestinal em camundongos. \* $P < 0,05$  vs. grupo salina + óleo de rícino. Analisados por ANOVA seguido do teste de Newman Keuls ( $p < 0,05$ ). Abreviaturas: PL: proteínas do látex; Sal: salina; LOP: loperamida.

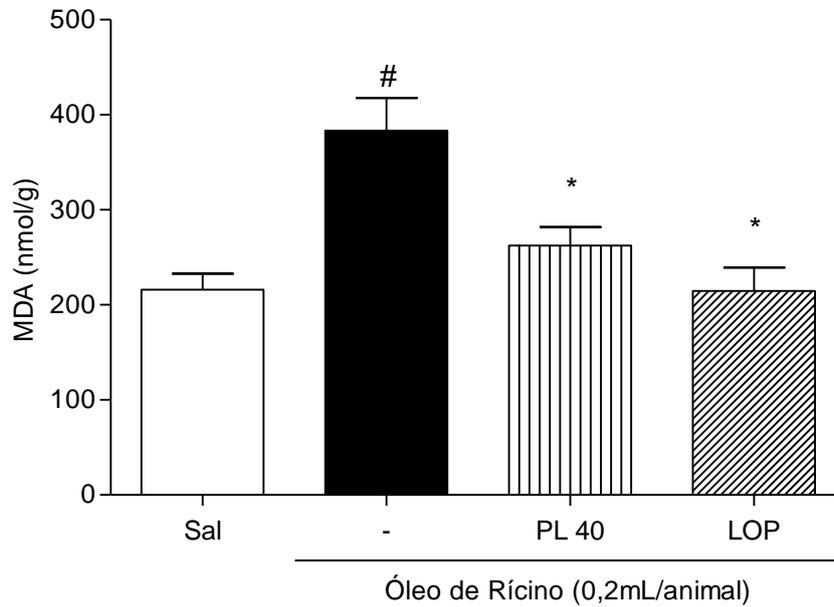
Os ensaios de atividade antidiarreica foram acompanhados da avaliação de marcadores bioquímicos envolvidos com o processo oxidativo. Após a avaliação da capacidade de inibir a diarreia, os animais do grupo controle salina, controle óleo de rícino, e aqueles submetidos a tratamento prévio com PL (40mg/kg), ou loperamida (5mg/kg), provenientes do ensaio de diarreia aguda induzida por óleo de rícino, tiveram amostras de partes do intestino, correspondentes ao duodeno, jejuno e íleo, retiradas para dosagem dos níveis de GSH e MDA. Foi evidenciado um aumento significativo nos níveis de glutatona (GSH) no grupo tratado com PL (40mg/kg, *i.p.*) em relação ao grupo não tratado (Figura 5). O conteúdo de GSH na mucosa intestinal tende a diminuir após a administração de óleo de rícino, mas os resultados do presente estudo mostraram que o pré-tratamento com PL foi capaz de manter os níveis de GSH ( $p < 0,05$ ) com resultados próximos ao apresentado no grupo controle salina e no grupo tratado com loperamida.



**Figura 5.** O efeito de PL sobre os níveis de glutatona (GSH) na mucosa intestinal de camundongos tratados com óleo de rícino. Os camundongos foram tratados por via intraperitoneal com PL (40mg/kg), ou loperamida (5mg/kg) por via oral. Sessenta minutos mais tarde, óleo de rícino (10 ml/kg, *v.o.*) foi administrado aos grupos experimentais, enquanto no grupo controle foi administrada solução salina. A administração de óleo de rícino promoveu uma redução nos níveis de GSH no intestino delgado. Este efeito foi parcialmente revertido quando os animais foram tratados com o PL ou loperamida. Os resultados são expressos como média  $\pm$  SEM de 5 animais por grupo. #  $P < 0,05$  vs. grupo salina; \*  $P < 0,05$  vs. óleo de rícino; ANOVA e teste Newman-Keuls.

Foi observado um aumento nos níveis de MDA no intestino delgado no grupo controle após a administração de óleo de rícino. No entanto, este parâmetro foi

significativamente reduzido nos animais tratados com PL na dose de 40mg/kg, bem como no grupo loperamida (Figura 6).



**Figura 6.** O efeito de PL na concentração de malondialdeído (MDA) na mucosa intestinal de camundongos tratados com óleo de rícino. Os camundongos foram tratados por via intraperitoneal com PL (40mg/kg), ou loperamida (5mg/kg) por via oral. Sessenta minutos mais tarde, óleo de rícino (10 ml/kg, v.o.) foi administrado aos grupos experimentais, enquanto no grupo controle foi administrada solução salina. O óleo de rícino, evidentemente, promoveu um aumento nos níveis de MDA no intestino delgado. Quando os animais foram pré-tratados com PL ou loperamida, este efeito foi revertido. Os resultados são expressos como médias  $\pm$  SEM de 5 animais por grupo. # P <0,05 vs. grupo salina; \* P <0,05 vs. grupo óleo de rícino; ANOVA e teste Newman-Keuls.

## 6. DISCUSSÃO

A diarreia induzida por óleo de rícino é um tipo de diarreia secretória, já que o ácido ricinoleico, ingrediente ativo do óleo de rícino, induz uma resposta diarreica hipersecretora, diminuindo a absorção de líquidos, aumentando a secreção de eletrólitos, e alterando a motilidade intestinal. (STEWART; GAGINELLA; BASS, 1975; MASCOLO et al., 1994; ALMEIDA et al., 1995; SASIDHARAN et al., 2007; ARAÚJO et al., 2015). Ao ser ingerido por via oral, o óleo de rícino sofre ação de lipases, liberando ácido ricinoleico no lúmen intestinal, que acaba sendo absorvido. O contato direto do ácido ricinoleico com a mucosa intestinal induz uma resposta osmótica que estimula a atividade peristáltica, provoca alterações na permeabilidade de eletrólitos da mucosa intestinal, estimula a secreção de óxido nítrico (NO), prostaglandinas endógenas (PGs), fator de ativação de plaquetária (PAF), taquicininas, e adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP) (WATSON; GORDON, 1962; IZZO et al., 1999; MCKEON; LIN; STAFFORD, 1999; YOSHIO et al., 1999; PALOMBO, 2006; ARAÚJO et al., 2015).

Vários estudos tentam explicar os mecanismos de ação envolvidos no efeito laxativo do óleo de rícino, mas este ainda não foi definido com clareza. Apesar disso os experimentos que utilizam óleo de rícino como agente indutor da diarreia são bastante comuns, pois o mesmo representa uma ferramenta eficaz no estudo dos sintomas da diarreia, como aumento da frequência de defecações, diminuição da consistência e eliminação aumentada das fezes (GURGEL, 2000).

A atividade antidiarreica de PL foi testada por meio do modelo de diarreia induzida por óleo de rícino, tendo como parâmetro analisado nesse ensaio à quantificação de fezes totais e diarreicas. Os resultados demonstraram que a administração de PL nas doses de 10, 20 e 40mg/kg, foi capaz de reduzir significativamente ( $p < 0,05$ ) o número total de fezes, bem como as fezes diarreicas em animais experimentais, quando comparadas ao controle positivo, sendo a dose de 40mg/kg a que apresentou melhores resultados. O grupo que recebeu loperamida (5mg/kg, v.o.) apresentou resultado semelhante. Uma vez que PL inibiu com sucesso a diarreia induzida por óleo de rícino, pode ser assumido que a ação antidiarreica foi mediada por um mecanismo antissecretório. O efeito antidiarreico pode estar relacionado com a inibição de NO, PGs, PAF, taquicininas, e cAMP, descritas anteriormente. Ao interferir na secreção desses componentes presentes na

diarreia por óleo de rícino, PL poderia provocar alterações no acúmulo de fluido no interior do lúmen, e/ou a interferir na atividade peristáltica no intestino delgado, podendo até alterar a permeabilidade de membrana das células que compõem a mucosa intestinal (ARAÚJO et al., 2015).

Em um recente estudo realizado por Fernandes et al., (2015) foi demonstrado o potencial de PL como anti-inflamatório em modelos animais. Os resultados obtidos devem-se em partes à inibição de mediadores inflamatórios, como serotonina, histamina, bradicinina e prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>). A atividade anti-inflamatória foi acompanhada pela redução na dosagem da concentração de mieloperoxidase, marcador de migração celular. Uma hipótese que pode ser levada em consideração é que a atividade antidiarreica de PL pode estar ligada a inibição de PGE<sub>2</sub>, pois como descrito na literatura, as prostaglandinas estão envolvidas no processo diarreico induzido por óleo de rícino (AUTORE; CAPASSO; MASCOLO, 1984; CAPASSO; MASCOLO; AUTORE, 1986; GURGEL, 2000).

Com o intuito de confirmar que a ação promovida por PL tem ligação com sua natureza proteica, proteínas do látex foram submetidas a tratamento químico e térmico e testadas no modelo de diarreia aguda induzida por óleo de rícino (Tabela 2).

A fração que passou por processo de aquecimento (PL 100°C, 40mg/kg, *i.p.*) perdeu sua atividade antidiarreica, quando administrada nos camundongos, em relação ao controle positivo. Isso demonstra que as proteínas responsáveis pela ação antidiarreica foram inativadas após passarem pelo tratamento térmico. Resultado semelhante foi observado por Fernandes et al., (2015) que demonstraram que uma fração proteica obtida a partir do látex de *Plumeria pudica* perdeu seu efeito anti-inflamatório após ser aquecida.

Os camundongos pré-tratados com a fração proteica submetida a tratamento químico (PL+IAA, 40mg/kg, *i.p.*) apresentaram uma redução significativa quantidade de fezes totais e diarreicas, quando comparadas ao controle óleo de rícino, demonstrando que a ação antidiarreica de PL foi mantida. Uma vez que o látex é coletado na presença de iodoacetamida (IAA) as proteinases cisteínicas endógenas tem sua atividade inibida, sugerindo assim, que a ação antidiarreica apresentada por PL possivelmente não esta envolvida com ação de proteases cisteínicas. Através de eletroforese foi possível visualizar uma mudança no padrão de bandas da fração PL+IAA (Figura 2). Essa classe de enzimas, comumente encontrada em látex

vegetal, foi anteriormente descrita por apresentar diferentes efeitos farmacológicos, como atividade anti-inflamatória e anticâncer exercida pela bromelaina, uma mistura de proteases cisteínicas obtidas a partir do caule abacaxi (SELIGMAN, 1962; HALE et al., 2005; SECOR JR et al., 2008; TOCHI et al., 2008), atividade antitumoral de proteínas do látex de *Calotropis procera* (OLIVEIRA et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2010) dentre outros.

Através da observação e auxílio de uma tabela de escores, avaliou-se a gravidade do processo diarreico induzido por óleo de rícino. Corroborando com os resultados anteriores, foi possível observar que PL e PL+IAA (40mg/kg, *i.p.*) reduziram a severidade do processo diarreico, em comparação com o grupo que recebeu apenas o agente indutor, assim como o grupo loperamida (5mg/kg, *v.o.*) (Figura 3). Isso reforça o potencial de PL contra a diarreia induzida por óleo de rícino.

Através do ensaio de *enteropooling* o fluido gerado pelo processo diarreico, presente no lúmen do intestino delgado, foi retirado e quantificado. Como resultado os camundongos pré-tratados com PL (40mg/kg, *i.p.*) apresentaram uma significativa redução no acúmulo de fluido intestinal (31,42%) proveniente do processo diarreico induzido por óleo de rícino em comparação com o grupo controle (Tabela 3). O grupo tratado com loperamida (5mg/kg, *v.o.*) apresentou resultado semelhante (40%). Trabalhos anteriores demonstram que a redução do volume e da fluidez das fezes é geralmente conseguida tanto pela redução do acúmulo de água no interior do lúmen como diminuição da perda de eletrólitos como sódio, potássio e cloretos (PALOMBO, 2006; ARAÚJO et al., 2015). Dessa forma, PL provavelmente atuou aumentando a reabsorção de eletrólitos, cloreto de sódio e água, correlacionando os resultados obtidos com estudos conduzidos por Dicarlo et al., (1994) e Chitme, Chandra e Kaushik (2004), que obtiveram resultados semelhantes em seus estudos.

Para avaliar o efeito de PL sobre a motilidade intestinal foi realizado o ensaio de trânsito gastrointestinal em camundongos, utilizando uma suspensão de carvão ativado como marcador (GAGINELLA et al., 1994). O método em questão é utilizado apenas como indicador da distância máxima percorrida pelo marcador, não fazendo distinção entre efeitos provenientes de alterações no trânsito intestinal ou esvaziamento estomacal.

O grupo tratado com PL (40mg/kg, *i.p.*) reduziu significativamente ( $P < 0,05$ ) o movimento de propulsão e o trânsito do marcador através do intestino delgado em

comparação com o grupo controle. O grupo tratado com loperamida (5mg/kg, v.o.) teve uma diminuição no trânsito, análoga ao grupo tratado com PL (40mg/kg). Esse efeito pode ajudar no controle da diarreia, uma vez que pode auxiliar na redução do número de defecações e também favorecer a absorção de água, pois o conteúdo intestinal vai passar de maneira mais lenta pelo lúmen do intestino e conseqüentemente poderá ocasionar um aumento na viscosidade das fezes (GURGEL, 2000).

Ao observar o efeito de PL sobre o trânsito intestinal, pode-se sugerir que as proteínas do látex podem estar atuando na via opióide. As drogas desta categoria incluem loperamida, elixir paregórico, difenoxilato, codeína e racecadotril. A ação antidiarreica dessa classe de drogas é mediada pelo receptor  $\mu$ -opióide na parede intestinal. Essas drogas diminuem o peristaltismo e aumentam atividade não propulsora de diferentes segmentos intestinais, assim como promovem a inibição da secreção de fluido. Dessa forma, diminuem o trânsito gastrointestinal e aumentam a absorção de fluidos e eletrólitos do trato gastrointestinal (GREENWOOD; DE SCHEPPER, 2004; RANG et al. 1997).

Com o objetivo de avaliar alterações em marcadores bioquímicos inflamatórios associados à diarreia induzida pelo óleo de rícino, partes do intestino dos animais utilizados no modelo de diarreia induzida por óleo de rícino foram coletadas para dosagem dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) e a concentração de malondialdeído (MDA) na mucosa intestinal. GSH atua como um antioxidante na mucosa intestinal, e a sua presença é importante para a manutenção da integridade da mucosa (SZABO; NAGY, 1992) e o MDA é um subproduto da peroxidação de lipídios amplamente usado como um marcador de estresse oxidativo. O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre a geração de espécies oxidativas e sistemas de defesa antioxidante inadequados. Esse desequilíbrio pode vir a causar danos celulares de maneira direta ou através de alterações nas vias de sinalização (CHIURCHIÙ; MACCARRONE, 2011).

Estudos demonstram que o óleo de rícino provoca redução no conteúdo de GSH e aumento nos níveis de MDA no intestino delgado dos animais. Entretanto nos animais tratados com PL (40mg/kg) os níveis de GSH e MDA foram mantidos próximos aos do grupo controle salina que não recebeu óleo de rícino, confirmando a capacidade de PL em preservar ou reforçar o sistema antioxidante. Os dados obtidos demonstram que os valores de inibição das fezes diarreicas promovidas por

PL (40mg/kg) foram acompanhados pelo aumento no conteúdo de GSH e redução nos níveis de MDA no intestino delgado, evidenciando dessa forma um efeito protetor das proteínas do látex sobre a mucosa intestinal dos animais.

Ao se investigar a atividade antidiarreica de proteínas do látex de *Plumeria pudica* (PL) em modelos de diarreia induzida por óleo de rícino, ficou evidente sua ação contra os sintomas da diarreia e seu efeito protetor contra o estresse oxidativo. No entanto, não foi possível definir qual/quais proteína(s) desempenha(m) esta ação e nem ao certo qual mecanismo de ação está envolvido na inibição do processo diarreico em estudo. Futuramente PL será alvo de fracionamento por etapas cromatográficas com o objetivo de purificar e identificar a(s) molécula(s) responsável(eis) pelas atividades biológicas descritas, para dessa forma podermos avançar com o estudo.

## 7. CONCLUSÕES

No presente estudo avaliou-se a atividade antidiarreica de uma fração proteica do látex de *P. pudica* (PL) solúvel em água em modelo animais de diarreia aguda induzida por óleo de rícino. A fração proteica de PL foi capaz de diminuir a diarreia induzida por óleo de rícino, diminuindo o trânsito, o volume e fluidez das fezes. Além disso, a fração PL também apresentou atividade antioxidante elevando o conteúdo de GSH e reduzindo níveis de MDA na mucosa intestinal. Ao submeter à fração PL a tratamento térmico, esta perdeu sua ação antidiarreica, provavelmente pela desnaturação das proteínas responsáveis pela atividade investigada. Após a fração PL ser coletada com um inibidor específico de proteinases cisteínicas, ainda continuou com seu efeito antidiarreico, demonstrando possivelmente que essa classe de proteases não está ligada ao efeito testado. Os dados demonstram o potencial de PL em inibir os sintomas da diarreia induzida por óleo de rícino em camundongos e seu efeito antioxidante na mucosa intestinal dos mesmos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, A. A.; KONNO, K. Latex: A Model for Understanding Mechanisms, Ecology, and Evolution of Plant Defense Against Herbivory. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 40, p. 311–331, 2009.

ALENCAR, N. M. N. ; FIGUEIREDO, I. S. T. ; VALE, M. R. ; BITENCURT, F. S. ; OLIVEIRA, J. S. ; RIBEIRO, R. A. ; RAMOS, M. V. . Anti-Inflammatory Effect of the Latex from *Calotropis procera* in Three Different Experimental Models: Peritonitis, Paw Edema and Hemorrhagic Cystitis. **Planta Medica**, v. 70, p. 1144–1149, 2004.

ALMEIDA, C. E.; KARNIKOWSKI, M. G.; FOLETO, R.; BALDISSEROTTO, B. Analysis of antidiarrhoeic effect of plants used in popular medicine. **Revista de Saúde Pública**, v. 29, p. 428–33, 1995.

AOKIA, Y.; TAKAHASHIA, S.; TAKAYAMAB, D.; OGATAC, Y.; SAKURAIC, N.; SUZUKIC, H.; ASAWATRERATANAKULB, K.; WITITSUWANNAKULE, D.; WITITSUWANNAKULF, R.; SHIBATAC, D.; KOYAMAB, T.; NAKAYAMAA, T. Identification of laticifer-specific genes and their promoter regions from a natural rubber producing plant *Hevea brasiliensis*. **Plant Science**, v. 225, p. 1–8, 2014.

ARAÚJO, T. S. L.; COSTA, D. S.; SOUSA, N. A.; SOUZA, L. K. M.; ARAÚJO, S.; ANA PATRÍCIA OLIVEIRA, A. P.; SOUSA, F. B. M.; SILVA, D. A.; BARBOSA, A. L. R.; LEITE, J. R. S. A.; MEDEIROS, J. V. R. Antidiarrheal activity of cashew GUM, a complex heteropolysaccharide extracted from exudate of *Anacardium occidentale* L. in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 174, p. 299–307, 2015.

AUTORE, G.; CAPASSO, F.; MASCOLO, N. Phenolphthalein stimulates the formation of histamine, 5-hydroxytryptamine and prostaglandin-like material by rat jejunum, ileum and colon. **British Journal Of Pharmacology**, v. 81, p. 347–348, 1984.

AWE, E. O.; KOLAWOLE, S. O.; AKEEL, K. O.; ABIODUN, O. O. Antidiarrheal activity of *Pyrenacanthastaudtii* Engl. (Iccacinaceae) aqueous leaf extract in rodents **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, p. 148–153, 2011.

BAUER, G.; FRIEDRICH, C.; GILLIG, C.; VOLLRATH, F.; SPECK, T.; HOLLAND, C. Investigating the rheological properties of native plant látex. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 11, p. 1–6, 2013.

BAUER, G.; GORB, S. N.; KLEIN, M. C.; NELLESEN, A.; TAPAVICZA, M. V.; SPECK, T. Comparative Study on Plant Latex Particles and Latex Coagulation in *Ficus benjamina*, *Campanula glomerata* and Three *Euphorbia* species. **PLOS ONE**, v. 9, p. 1–8, 2014.

BINDHU, O. S.; SINGH, M. K. Hemostatic, milk clotting and blood stain removal potential of cysteine proteases from *Calotropis gigantea* (L.) R. Br. Latex. **Pharmacognosy Magazine**, v. 10, p. 350–356, 2014.

BOSCHI-PINTO, C.; VELEBIT, L.; SHIBUYA, K. Estimating child mortality due to diarrhoea in developing countries. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 86, p. 710–717, 2008.

BROWN, S. H. *Plumeria pudica*. **Bridal Bouquet, Fiddle Leaf Plumeria**. University of Florida IFAS Extension. Disponível em: <<http://lee.ifas.ufl.edu/Hort/GardenPubsAZ/PlumeriaPudica.pdf>>. Acesso em: 25 maio 2015.

CAI, X.; LI, W.; YIN, L. Ultrastructure and cytochemical localization of acid phosphatase of laticifers in *Euphorbia kansui* Liou. **Protoplasma**, v. 238, p. 3–10, 2009.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 131–134, 2005.

CAPASSO, F.; MASCOLO, N.; AUTORE, G. Laxatives and the production of autocoids by rat colon. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 38, p. 627–629, 1986.

CHEN, L. C.; CHUNG, Y. C.; CHANG, C. T. Characterisation of an acidic peroxidase from papaya (*Carica papaya* L. cv Tainung No. 2) latex and its application in the determination of micromolar hydrogen peroxide in milk. **Food Chemistry**, v. 135, p. 2529–2535, 2012.

CHITME, H.R.; CHANDRA, M.; KAUSHIK, S. Studies on antidiarrhoeal activity of *Calotropis gigantea* R.Br. in experimental animals. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 7, p. 70–75, 2004.

CHIURCHIÙ, V.; MACCARRONE, M. Chronic inflammatory disorders and their redox control: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 15, p. 2605–2642, 2011.

CHOUDHARY, M.; KUMAR, V.; SINGH, S. Phytochemical and Pharmacological activity of *Genus Plumeria*: An updated review. **International Journal of Biomedical and Advance Research**, v. 5, p. 266–271, 2014.

CORNISH, K. Similarities and differences in rubber biochemistry among plant species. **Phytochemistry**, v. 57, p. 1123–1134, 2001.

DAS, A.; DUTTA, A. K.; RAZZAQUE, S.; SAHA, B.; GOPE, P. S.; CHOUDHURY, N. Analgesic and Antidiarrheal Properties of the Latex of *Calotropis Procera*. **International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives**, v. 2, p. 521–525, 2011.

DATA, E. S.; NOTTINGHAM, S. F.; KAYS, S. J. Effect of sweetpotato latex on sweetpotato weevil (Coleoptera: Curculionidae) feeding and oviposition. **Journal of Economic Entomology**, v. 89, p. 544–49, 1996.

DEVPRAKASH; TEMBARE, R.; GURAV, S.; KUMAR G. P. S.; MANI, T. T. An review of phytochemical constituents and pharmacological activity of *Plumeria* species. **International Journal of Current Pharmaceutical Research**, v. 4, 2012.

DICARLO, G. D.; MASCOLO, N.; IZZO, A. A.; CAPASSO, F.; AUTORE, G. Effects of quercetin on gastrointestinal tract in rats and mice. **Phytotherapy Research**, v. 8, p. 42–44, 1994.

DOUGHTY, D. B. **Urinary & fecal incontinence: Current management concepts**. Elsevier Health Sciences, 2012.

DUSSOURD, D. E. Entrapment of aphids and whiteflies in lettuce látex. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 88, p. 163–72, 1995.

FAHN, A. Secretory tissues in vascular plants. **New Phytol**, v. 108, p. 229–57, 1988.

FARTHING, M. J. G. Antisecretory Drugs for Diarrheal. **Dig Dis**, v. 24, p. 47–58, 2006.

FERNANDES, H. B.; MACHADO, D. L.; DIAS, J. M.; BRITO, T. V.; BATISTA, J. A.; SILVA, R. O.; PEREIRA, A. C. T.; FERREIRA, G. P.; RAMOS, M. V.; MEDEIROS, J. -V. R.; ARAGAO, K. S.; RIBEIRO, R. A.; BARBOSA, A. L. R.; OLIVEIRA, J. S. Laticifer proteins from *Plumeria pudica* inhibit the inflammatory and nociceptive responses by decreasing the action of inflammatory mediators and pro-inflammatory cytokines. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, p. 269–277, 2015.

GAGINELLA, T. S.; MASCOLO, N.; IZZO, A. A.; AUTORE, G.; CAPASSO, F. Nitric oxide as a mediator of bisacodyl and phenolphthalein laxative action: induction of nitric oxide synthase. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 270, p. 1239–1245, 1994.

GERALD, N. T.; JULES, R. K.; OMER, B. N.; DONATIEN, G. Antidiarrhoeal and antimicrobial activities of *Emilia coccinea* (Sims) G. Don extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 278–283, 2017.

GREENWOOD, V. M. B.; GARDNER, C. J.; LITTLE, P. J.; HICKS, G. A.; DEHAVEN-HUDKINS, D. L. Preclinical studies of opioids and opioid antagonists on gastrointestinal function. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 16, p. 46–53, 2004.

GURGEL, L. A. **Avaliação experimental da atividade antidiarréica do látex do *Croton urucurana* Baill.** Fortaleza, 2000. Dissertação (Pós-Graduação em Farmacologia) - Universidade Federal do Ceará.

GURGEL, L. A.; MARTINS, D. T. O.; MATTOS, P. O.; RAO, V. S. Estudo da atividade antidiarréica e antisecretória intestinal do látex do *Croton urucurana* Baill. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 39–42, 2002a.

GURGEL, L. A.; MARTINS, D. T. O.; MATTOS, P. O.; RAO, V. S. Estudo da atividade do látex do *Croton urucurana* Baill. sobre o trânsito gastrintestinal de camundongos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 42–44, 2002b.

- GUTIERREZ, R. M. P.; MITCHELL, S.; SOLIS, R.V. Psidium guajava: a review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 117, p. 1–27, 2008.
- HAGEL, J. M.; YEUNG, E. C.; FACCHINI, P. J. Got milk? The secret life of laticifers. **Trends in Plant Science**, v. 13, p. 631–39, 2008.
- HALE, L. P.; GREER, P. K.; TRINH, C. T.; JAMES, C. L. Proteinase activity and stability of natural bromelain preparations. **International Immunopharmacology**, v. 5, p. 783–793, 2005.
- HUNTER, J. Reconsidering the functions of latex. **Trees**, v. 9, p. 1–5, 1994.
- IZZO, A. A.; MASCOLO, N.; CAPASSCO, R.; GERMANO, M. P.; DE PASUELE, R.; CASPASSCO, F. Inhibitory effect of cannabinoid agonists on gastric emptying in rat. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 360, p. 221–223, 1999.
- KELLY, P. Infectious diarrhoea. **Medicine**, v. 39, p. 202–206, 2011.
- KENT, A. J.; BANKS, M. R. Pharmacological management of diarrhea. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 39, p. 495–507, 2010.
- KONNO, K. Plant latex and other exudates as plant defense systems: roles of various defense chemicals and proteins contained therein. **Phytochemistry**, v. 72, p. 1510–1530, 2011.
- KUMAR, P. S.; SURESH, E.; KALAVATHY, S. Review on a potential herb *Calotropis gigantea* (L.) R. Br. **Scholars Academic Journal of Pharmacy**, v. 2, p. 135–143, 2013.
- KUMAR, S.; DEWAN, S.; SANGRAULA, H.; KUMAR, V. L. Anti-diarrhoeal activity of the latex of *Calotropis procera*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p. 115–118, 2001.
- LAEMMILI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.
- LEWINSOHN, T. M. The geographical distribution of plant latex. **Chemoecology**, v. 2, p. 64–68, 1991.
- LIU, L.; JOHNSON, H. L.; COUSENS, S.; PERIN, J.; SCOTT, S.; LAWN, J. E.; RUDAN, I.; CAMPBELL, H.; CIBULSKIS, R.; LI, M.; MATHERS, C.; BLACK, R. E. Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. **The Lancet**, v. 379, p. 2151–2161, 2012.
- LUCETTI, D. L.; LUCETTI, E. C. P.; BANDEIRA, M. A. M.; VERAS, H. N. H.; SILVA, A. H.; LEAL, L. K. A. M.; LOPES, A. A.; ALVES, V. C. C.; SILVA, G. S.; BRITO, G. A.; VIANA, G. B. Anti-inflammatory effects and possible mechanism of action of

lupeol acetate isolated from *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel. **Journal of Inflammation**, v. 7, p. 1–11, 2010.

MARTINS, J. L. R.; RODRIGUES, O. R. L.; SOUSA, F. B.; FAJEMIROYE, J. O.; GALDINO, P. M.; FLORENTINO, I. F.; COSTA, E. A. Medicinal species with gastroprotective activity found in the Brazilian Cerrado. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 29, p. 1–14, 2015.

MASCOLO, N.; IZZO, A.A.; AUTORE, G.; BARBATO, F.; CAPASSO, F. Nitric oxide and castor oil-induced diarrhoea. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 268, p. 291–295, 1994.

MCKEON, T. A.; LIN, J. J.; STAFFORD, A. E. Biosynthesis of ricinoleate in castor oil. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 464, p. 37–47, 1999.

MIHARA, M.; UCHIYAMA, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. **Analytical Biochemistry**, v. 86, p. 271–278, 1978.

MISHRA, B. B.; TIWARI, V. K. Natural products: an evolving role in future drug discovery. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 4769–4807, 2011.

MORENO, A. C.; FERNANDES FILHO, A.; GOMES, T. A. T.; RAMOS, S. T. S.; MONTEMOR, L. P. G.; TAVARES, V. C.; SANTOS FILHO, L.; IRINO, K.; MARTINEZ, M. B. Etiology of childhood diarrhea in the northeast of Brazil: significant emergent diarrheal pathogens. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 66, p. 50–57, 2010.

OCHOA, B.; SURAWICZ, C. M. **Diarrheal Diseases – Acute and Chronic**. University of Washington School of Medicine, Seattle, WA – Published October 2002. Updated April 2007. Updated December 2012.

OLIVEIRA, J. S.; BEZERRA, D. P.; FREITAS, C. D. T.; MARINHO FILHO, J. D. B.; MORAES, M. O.; PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L. V.; RAMOS, M. V. In vitro cytotoxicity against different human cancer cell lines of laticifer proteins of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. **Toxicology in Vitro**, v. 21, p. 1563–1573, 2007.

OLIVEIRA, J. S. **Caracterização bioquímica e atividade citotóxica *in vitro* e antitumoral *in vivo* de proteínas do látex de *Calotropis procera***. Fortaleza, 2011 153 f. Tese (Doutorado em Bioquímica e Biologia Molecular) – Universidade Federal do Ceará.

OLIVEIRA, J. S.; COSTA-LOTUFO, L. V.; BEZERRA, D. P.; ALENCAR, N. M. N.; MARINHO-FILHO, J. D. B.; FIGUEIREDO, I. S. T.; MORAES, M. O.; PESSOA, C.; ALVES, A. P. N. N.; RAMOS, M. V. In vivo growth inhibition of sarcoma 180 by latex proteins from *Calotropis procera*. **Naunyn-Schmied Archives of Pharmacology**, p. 1–11, 2010.

PALOMBO, E. A. Phytochemicals from traditional medicinal plants used in the treatment of diarrhoea: modes of action and effects on intestinal function. **Phytotherapy Research**, v. 20, p. 717–724, 2006.

PATEL, K.; THILLAINAYAGAM, A. V. Diarrhoea. **Medicine**, v. 37, p. 23–27, 2011.

POST, J.; VAN DEENEN, N.; FRICKE, J.; KOWALSKI, N.; WURBS, D.; SCHALLER, H.; EISENREICH, W.; HUBER, C.; TWYMAN, R. M.; PRÜFER, D.; GRONOVER, C. S. Laticifer-specific cis-prenyltransferase silencing affects the rubber, triterpene, and inulin content of *Taraxacum brevicorniculatum*. **Plant Physiology**, v. 158, p. 1406–1417, 2012.

POWELL, C. V.; JENKINS, H. R. Toddler diarrhoea: is it a useful diagnostic label? **Arch. Dis. Child.**, v. 97, p. 84–86, 2012.

RAJ, S.; DAS, G.; POTHEN, J.; DEY, S. K. Relationship between latex yield of *Hevea brasiliensis* and antecedent environmental parameters. **The International Journal of Biometeorology**, v. 49, p. 189–96, 2005.

RAHMAN, M. K.; BARUA, S.; ISLAM, M. F.; ISLAM, M. R.; SAYEED, M. A.; PARVIN, M. S.; ISLAM, M. E. Studies on the anti-diarrheal properties of leaf extract of *Desmodium puchellum*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 3, p. 639–643, 2013.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. 3. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 19, p. 306-320, 1997.

RAO, H. C. Y.; SANTOSH, P.; RAKSHITH, D.; SATISH, S. Molecular characterization of an endophytic *Phomopsis liquidambaris* CBR-15 from *Cryptolepis buchanani* Roem. and impact of culture media on biosynthesis of antimicrobial metabolites. **3 Biotech**, v. 5, p. 165–173, 2015.

ROBERT, A.; NEZAMIS, J. E.; LANCASTER, C.; HANCHAR, A. J.; KLEPPER, M. S. Enteropooling assay, a test for diarrhea produced by prostaglandins. **Prostaglandins**, v. 11, p. 809–828, 1976.

SARATHA, V.; SUBRAMANIAN, S. P. Lupeol, a triterpenoid isolated from *Calotropis gigantea* latex ameliorates the primary and secondary complications of FCA induced adjuvant disease in experimental rats. **Inflammopharmacology**, v. 20, p. 27–37, 2012.

SASIDHARAN, S.; LATHA, Y. L.; ZURAINI, Z.; SURYANI, S.; SANGETHA, S.; SHIRLEY, L. Antidiarrheal and antimicrobial activities of *Stachytarpheta jamaicensis* leaves. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 39, p. 245–248, 2007.

SCHILLER, L.R. Definitions, pathophysiology, and evaluation of chronic diarrhea. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 26, p. 551–562, 2012.

SECOR JR, E. R.; CARSON, W. F.; SINGH, A.; PENSA, M.; GUERNSEY, L. A.; SCHRAMM, C. M.; THRALL, R. S. Oral Bromelain Attenuates Inflammation in an Ovalbumin-induced Murine Model of Asthma. **Evidence-Based Research in Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, p. 61–69, 2008.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R.H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 24, p. 192–205, 1968.

SELIGMAN, B. Oral bromelains as adjuncts in the treatment of acute thrombophlebitis. **Angiology**, v. 20, p. 22–26, 1969.

SEN, T.; SAMANTA, S. K. Medicinal Plants, Human Health and Biodiversity: A Broad Review. **Biotechnological Applications of Biodiversity**, v. 147, p. 59–110, 2015.

SHAIDA, F.; SALMY, S.; TAN, L.; TENGGU, S.; TENGGU, M. Chemical components of the essential oils from three species of malaysian *Plumeria* and their effects on the growth of selected microorganisms. **Journal of Bioscience**, v. 19, p. 1–7, 2008.

SHINDE, P. R.; PATIL, P. S.; BAIRAGI, V. A. Phytopharmacological Review of *Plumeria* species. **Scholars Academic Journal of Pharmacy**, v. 3, p. 217–227, 2014.

SILVA, M. C. C.; SILVA, A. B.; TEIXEIRA, F. B.; SOUSA, P. C. P.; RONDON, R. M. M.; HONÓRIO JÚNIOR, J. E. R.; SAMPAIO, L. R. L.; OLIVEIRA, S. R.; HOLANDA, A. N. M.; VASCONCELOS, S. M. M. Therapeutic and biological activities of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, p. 332–336, 2010.

SOARES, P. M.; LIMA, S. R.; MATOS, S. G.; ANDRADE, M. M.; PATROCÍNIO, M. C.; FREITAS, C. D. T.; RAMOS, M. V.; CRIDDLE, D. N.; CARDI, B. A.; CARVALHO, K. M.; ASSREUY, A. M. S.; VASCONCELOS, S. M. M. Antinociceptive activity of *Calotropis procera* latex in mice. **Journal of ethnopharmacology**, v. 99, p. 125–129, 2005.

STEWART, J. J.; GAGINELLA, T. S.; BASS, P. Actions of ricinoleic acid and structurally related fatty acids of the gastrointestinal tract. I. Effects on smooth muscle contractility *in vitro*. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 195, p. 347–54, 1975.

STRASINGER, S. K.; DI LORENZO, M. S. **Urinalysis and body fluids**. FA Davis, 2008.

SZABO, S.; NAGY, L. Pathways, mediator and mechanisms of gastroduodenal mucosal injury. **Acta Physiologica Hungarica**, v. 80, p. 9–21, 1992

TRADTRANTIP, L.; NAMKUNG, W.; VERKMAN, A. S. Crofelemer, an Antisecretory Antidiarrheal Proanthocyanidin Oligomer Extracted from *Croton lechleri*, Targets Two Distinct Intestinal Chloride Channels. **Molecular Pharmacology**, v. 77, p. 69–78, 2010.

TANG, C.; XIAO, X.; LI, H.; FAN, Y.; YANG, J.; QI, J.; LI, H. Comparative Analysis of Latex Transcriptome Reveals Putative Molecular Mechanisms Underlying Super Productivity of *Hevea brasiliensis*. **PLOS ONE**, v. 8, p. 1–18, 2013.

TOCHI et al., Therapeutic application of pineapple protease (bromelain): a review. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 7, p. 513–520, 2008.

TUNG, A. V. Pepohon Pinggir Jalan Daun Lebar. **Amiza Publishing**, p. 6–11, 1999.

UNICEF et al. Committing to Child Survival: A Promise Renewed, Progress Report 2013, UNICEF. **New York**, 2013.

WANG, L. W.; XU, G.; WANG, J. Y.; SU, Z. Z.; LIN, F. C.; ZHANG, C. L.; KUBICEK, C. P. Bioactive metabolites from *Phoma* species, an endophytic fungus from the Chinese medicinal plant *Arisaema erubescens*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, p. 1231–1239, 2012.

WATSON, W. C.; GORDON, R. S. Studies on the digestion, absorption and metabolism of castor oil. **Biochemical Pharmacology**, v. 11, p. 229–236, 1962.

WHYTE, L. A.; JENKINS, H. R. Pathophysiology of Diarrhoea. **Paediatrics And Child Health**, v. 22, p. 443–447, 2012.

World Health Organization. **World health report**. Geneva: p. 120-125, 2004.

YAGAMI, T.; SATO, M.; NAKAMURA, A.; KOMIYAMA, T.; KITAGAWA, K.; AKASAWA, A.; IKEZAWA, Z. Plant defense-related enzymes as latex antigens. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 101, p. 379–85, 1998.

YOSHIO, K.; KAZUKO, S.; BUNSYO, M.; KAZUNORI, H.; ATSUSHI, I.; YASUHIRO, K. Relationship between antidiarrhoeal effects of Hange-Shashin-To and its active components. **Phytotherapy Research**, v. 13, n. 468–473, 1999.

**ANEXO I: Certificado de Aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí.**



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA  
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL**

Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550  
Telefone (86) 3215-5734 \_e-mail: ceeapi@ufpi.edu.br

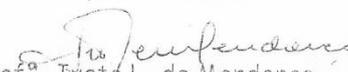


**CERTIFICADO**

Certificamos que o Projeto intitulado "**Bioprospecção de plantas do Estado do Piauí com vistas à identificação e caracterização de proteínas com potencial biotecnológico**", protocolo nº **037/15**, sob a responsabilidade de **JEFFERSON SOARES DE OLIVEIRA**- que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de Pesquisa Científica- encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **Aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data 27/08/2015.

Vigência do Projeto	<b>Outubro/ 2015 à Julho/ 2017</b>
Espécie/ linhagem	<b>Camundongo heterogênico/Swiss</b>
Nº de Animais	<b>192</b>
Peso/ Idade	<b>20-25 g/ 45 dias</b>
Sexo	<b>Machos</b>
Origem	<b>Biotério do Centro de Ciências Agrárias- CCA da Universidade Federal do Piauí.</b>

Teresina, 27 de Agosto de 2015.

  
Prof.<sup>a</sup> Ivete L. de Mendonça  
Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI  
Coordenadora