



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM PLANTAS MEDICINAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

SUYLANE SOBRAL DE SOUSA

**ATIVIDADE ANTIDIARREICA DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE
Tocoyena hispidula Standl. (RUBIACEAE) EM CAMUNDONGO**

TERESINA – PI

2019

SUYLANE SOBRAL DE SOUSA

**ATIVIDADE ANTIDIARREICA DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE
Tocoyena hispidula Standl. (RUBIACEAE) EM CAMUNDONGO**

Dissertação apresentada a Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Núcleo de Pesquisas em Plantas Mediciniais/Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Piauí, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Rita de Cássia
Meneses Oliveira

**TERESINA – PI
2019**

SUYLANE SOBRAL DE SOUSA

**ATIVIDADE ANTIDIARREICA DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE
Tocoyena hispídula Standl. (RUBIACEAE) EM CAMUNDONGO**

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Núcleo de Pesquisas em Plantas Mediciniais/Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Piauí, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

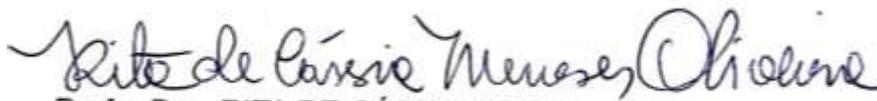
Orientadora: Profa. Dra. Rita de Cássia Meneses Oliveira

Data de aprovação: _____ de _____ de 2019

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. PEDRO JORGE CALDAS MAGALHÃES
Examinador externo


Prof. Dr. HELIO DE BARROS FERNANDES
Examinador interno


Profa. Dra. RITA DE CÁSSIA MENESES OLIVEIRA
Presidente

Agradecimientos

A Deus, por segurar a minha mão e ter me erguido e guiado em todos os momentos, pela proteção, pelas oportunidades e por ter me feito estar no momento certo e na hora certa, por ter me dado a opção de escolha nas estradas deste caminho e por iluminar meus amigos que foram presença Dele na minha vida.

À Universidade Federal do Piauí junto ao Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais e ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia pelo subsídio à realização deste trabalho, aliado a seu potencial científico e tecnológico.

Aos Coordenadores do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia: Fernanda Regina de Castro Almeida e Aldeídia Pereira de Oliveira pela dedicação e empenho para uma boa avaliação do Programa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Piauí pelo apoio financeiro.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior), pelo suporte técnico através do Portal de Periódicos.

À Professora Rita de Cássia Meneses Oliveira, minha orientadora, pelos ensinamentos, paciência, sabedoria, dedicação e principalmente pelo apoio e compreensão que me fizeram insistir, me mostrando sempre que para tudo haveria uma solução e que a persistência era o melhor caminho, pelo carinho e humildade com o qual me ensinou.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia: Aldeídia Pereira de Oliveira, Fernanda Regina de Castro Almeida, Rita de Cassia Meneses Oliveira, Rosimeire Ferreira dos Santos, Salete Maria da Rocha Cipriano Brito, Fernando Aécio Amorim Carvalho, Francisco de Assis Oliveira, Jand Venes Rolim Medeiros, Elisangela Cláudia Oliveira e demais professores por todos os ensinamentos transmitidos durante as aulas e o carinho com o qual me conduziram durante o mestrado.

À Dra. Mariana Helena Chaves e sua orientanda Elcilene Alves de Sousa pelo fornecimento dos extratos, frações e por todo o apoio com a parte química do estudo.

Ao Prof. Dr. Paulo Humberto Moreira Nunes pelo fornecimento do carvão ativado e carboximetilcelulose.

Ao doutorando Douglas Soares, que teve grande parcela de contribuição para minha formação e execução deste trabalho.

Aos amores da minha vida, Silvio Sousa, Luísa Ramos e Andrêssa Carvalho, vocês sempre estiveram aqui, me dando força, me ensinando a ter paciência, me

dando colo, sendo minha fortaleza repleta de motivação e muito amor, me ensinando que podemos ter dias de lutas, mas que há também dias de glória e que lá fora o céu é azul e lindo!

A todos os meus colegas de turma em especial Lucas Solyano, Flaviano Pinheiro e Rodolfo Ritchelle por todo o companheirismo, auxílio e amizade que tornaram a minha jornada mais prazerosa.

Aos amigos do NPPM: Ian Jhemes, Polyanna Negreiros, Rodrigo Gonçalves, Ruan Pablo, Ana Rita S. França, Aline Suelen, Daniel Cunha, Pedro Simão, Sávio Moreira, Tayane Izabele, José Luís Borges, Julianne Portela, Teresa Mariana Santos, Maisa Campelo, Benedito Neto, Valdelânia Gomes, Josyanne Neves, Josynaria Neves, Rafael Almendra, Kalina Paz, Carlos Alberto pelo apoio e momentos de descontração.

Agradeço de modo especial aos meus amigos Oscar Fonseca, Lorranya Eveli e Jessica Lindoso, pela paciência, motivação, o ombro amigo, pelos ensinamentos e a doce amizade, vocês foram mais que amigos, verdadeiros irmãos, sou extremamente grata por ter convivido com vocês que tornaram minha jornada mais amena e graciosa durante essa “delicada mistura de desistir e insistir”.

A Francilene Vieira da Silva (meu espelho), Hélio Barros e Irisdalva Oliveira, tutores e amigos da Gastro, vocês me levaram a este mundo científico me ensinando, incentivando, dando oportunidade e confiança, juntos tivemos momentos engraçados, de luta e também de glória, sou muito feliz de ter tido uma base científica tão maravilhosa, foram mais que professores verdadeiros amigos e, mais do que amigos, verdadeiros irmãos que o NPPM me proporcionou.

Aos Professores Luciano da Silva Lopes (UFPI) e Ionara Nayana Gomes Passos (AESPI/UFMA), por terem me incentivado e por todo o impulsionamento no início da vida científica, vocês foram cruciais no meu desenvolvimento.

Aos meus professores de graduação, hoje grandes amigos, que seguiram me auxiliando diante de cada adversidade e cada escolha realizada em especial à Profa Maria do Remédios Mendes de Brito, Rian Felipe de Melo Araújo e Laisa Lis Fontenele de Sá.

Aos funcionários da Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, pelo atendimento e dedicação junto à secretaria.

Aos meus familiares, Sônia Ramos (Mãe), Irmãos (Suellen S. Sousa/ Silvio Jr Oliveira e Samuel Oliveira), Suertane Costa e Pedro (meus segundos Pais), Tia

Derivane Pereira, Tia Maria das Graça Pereira, Tio Raimundo Lopes, Tharlles Santos, Diego Santos, Nilson Cesar da Silva, Yasmin Batista, pelo carinho, incentivo e por compreenderem minha ausência em alguns momentos.

Aos amigos em especial, Henrique Garcia, Raissa Lima, Samatha Reis, Renata Thais Nascimento, Herlem Rodrigues, Nancy Lopes, Maria da Conceição Sousa, Gerlânia Agostinho, Orlando Morais e Joanna Lavor por todo o apoio.

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta na elaboração e execução deste trabalho.

Muito obrigada!

Suylane Sobral de Sousa

“Algo só é impossível até que alguém duvide e resolva provar o contrário”.

(Albert Einstein)

RESUMO

Atividade antidiarreica do extrato etanólico das folhas de *Tocoyena hispidula* Standl. (Rubiaceae) em camundongo

A diarreia é um dos distúrbios gastrintestinais que pode ser debilitante e quando não tratada pode oferecer risco ao paciente, caracterizada pela eliminação excessiva de líquidos e sais do corpo na forma de fezes líquidas. A terapia farmacológica atua de forma eficiente no controle do estado diarreico, entretanto, os fármacos apresentam efeitos adversos que podem agravar o estado clínico. A *Tocoyena hispidula* Standl. é conhecida popularmente como “flor-do-cerrado” e “angelca”, podendo ser localizada nas regiões Norte e Nordeste. No Piauí, a *Tocoyena hispidula* Standl. é encontrada no município de Campo Maior usada popularmente no tratamento de dor abdominal e inflamação do útero. Objetivou-se dessa forma avaliar a atividade antidiarreica do extrato etanólico das folhas de *Tocoyena hispidula* Standl em camundongos. Inicialmente realizou-se a caracterização química do extrato etanólico Th-EtOH_f em HPLC, posteriormente realizou-se o teste de toxicidade aguda do extrato etanólico Th-EtOH_f conforme a OECD 423/2011. A atividade antidiarreica do extrato (Th-EtOH_f) foi investigada no modelo de diarreia aguda e *enteropooling* induzido por óleo de rícino em camundongos tratados com Th-EtOH_f (10; 50; 100 mg/kg, v.o.), salina (2,5 mL/kg, v.o.) ou loperamida (5 mg/kg, v.o.) e, 1 hora depois receberam óleo de rícino (10 mL/kg, v.o.) e foram monitorados durante 4 horas. Logo após foram analisadas a severidade diarreica, a massa total das fezes e a medida do volume do conteúdo intestinal. Com o intuito de avaliar o efeito do Th-EtOH_f sobre o trânsito intestinal em camundongo, os animais receberam inicialmente o óleo de rícino e 1 hora depois, receberam o tratamento com Th-EtOH_f (50 mg/kg, v.o). Decorrida mais 1 hora, receberam 0,2 mL de carvão ativado (v.o), sendo eutanasiados após 20 min. Ao final, a distância percorrida pelo carvão foi então mensurada. O envolvimento das vias opióide e muscarínica no trânsito foi avaliada, analisou-se também o desempenho do Th-EtOH_f na diarreia de cunho inflamatório (PGE₂, 100 µg/kg, v.o.). Para isso os animais foram pré-tratados oralmente com Th-EtOH_f (50 mg/kg, v.o.), salina ou loperamida (5 mg/kg). Decorrido 30 min os animais foram eutanasiados e o volume do conteúdo intestinal foi então analisado. O resultado da análise química do extrato em HPLC revelaram bandas sugestivas de compostos da classe dos iridoides e flavonoides, o extrato não demonstrou sinais de toxicidade aguda por via oral conforme os testes preconizados nas doses avaliadas apresentaram um efeito significativo (*p< 0,05), diminuindo a quantidade total de fezes em 38,07%; 50,33%; 52,98% (respectivamente) e fezes diarreicas em 30,52%; 46,98%; 46,18% apresentando também valores significativos no protocolo de *enteropooling*, com melhores resultados na dose de 50 mg/kg, permanecendo esta como padrão para os demais testes. O Th-EtOH_f não exerceu efeitos significativos no modelo de diarreia induzida por PGE₂. O Th-EtOH_f reduziu o trânsito gastrintestinal, através da via muscarínica, sendo capaz de diminuir significativamente em 43,07% a quantidade total de fezes e reduzir a produção de fluidos intestinais. Diante dos resultados expostos, foi possível constatar a atividade antidiarreica do Th-EtOH_f, mostrando ser um potencial insumo, para produção de medicamentos, para o tratamento de doenças diarreicas.

Palavras chaves: *Tocoyena*, Extrato, Óleo de rícino, Rubiaceae, Angeliquinha, Receptor M₃

ABSTRACT

Antidiarrheal activity of the ethanolic extract of the leaves of *Tocoyena hispidula* Standl. (Rubiaceae) in mice

Diarrhea is one of the gastrointestinal disorders that can be debilitating and when left untreated may pose a risk to the patient, characterized by the excessive elimination of liquids and salts from the body in the form of liquid feces. Pharmacological therapy is effective in controlling the diarrheal state, however, the drugs have adverse effects that may aggravate the clinical state. *Tocoyena hispidula* Standl. It is popularly known as "cerrado flower" and "angelca" and can be located in the North and Northeast. In Piauí, *Tocoyena hispidula* Standl. It is found in the municipality of Campo Maior popularly used to treat abdominal pain and inflammation of the uterus.. The aim of this study was to evaluate the antidiarrheal activity of the ethanolic extract from the leaves of *Tocoyena hispidula* Standl in mice. Initially the chemical characterization of the Th-EtOH_f ethanolic extract was performed in HPLC, after which the acute toxicity test of the ethanolic extract Th-EtOH_f according to OECD 423/2011. The antidiarrheal activity of the extract (Th-EtOH_f) was investigated in the model of acute diarrhea and enteropooling induced by castor oil in mice treated with Th-EtOH_f (10, 50, 100 mg / kg, / kg) or loperamide (5 mg / kg) and then 1 hour later received castor oil (10 ml / kg, vol) monitored for 4 hours. Soon after, the diarrheal severity, the total weight of the feces and the measurement of the volume of the intestinal contents were analyzed. In order to evaluate the effect of Th-EtOH_f on intestinal transit in mice, the animals initially received castor oil and 1 hour later were treated with Th-EtOH_f (50 mg / kg, v.o). After another 1 hour, they received 0.2 mL of activated charcoal (v.o) and were euthanized after 20 min. At the end, the distance traveled by the coal was then measured. The involvement of the opioid and muscarinic pathways in the traffic was evaluated, the performance of Th-EtOH_f in inflammatory diarrhea (PGE₂, 100 µg / kg, v.o.) was also investigated. For this the animals were orally pretreated with Th-EtOH_f (50 mg / kg, v.o.), saline or loperamide (5 mg / kg). After 30 min the animals were euthanized and the volume of the intestinal contents was analyzed. The results of HPLC extract analysis revealed bands suggestive of compounds of the class of iridoids and flavonoids, the extract did not demonstrate acute toxicity according to The antidiarrheal effects in the doses evaluated had a significant effect (* p <0.05), reducing the total amount of feces in 38.07%; 50.33%; 52.98% (respectively) and diarrheal stools in 30.52%; 46.98%; 46.18%, also presenting values significant in the protocol of enteropooling, with better results in the dose of 50 mg / kg, remaining this as standard for the other tests. Th-EtOH_f had no significant effect on the PGE₂-induced diarrhea model. Th-EtOH_f reduced the gastrointestinal 43.07% transit through the muscarinic pathway, being able to significantly decrease the total amount of feces and reduce the production of intestinal fluids. In view of the aforementioned results, it was possible to verify the antidiarrheal activity of Th-EtOH_f, proving to be a potential therapeutic input for the treatment of diarrheal diseases.

Key words: Tocoyena, Extract, Castor Oil, Rubiaceae, Angeliquin, M₃ Receptor

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Efeito do extrato etanólico de Th-EtOH _f (2.000 mg/kg, v.o) sobre o peso absoluto (g) dos órgãos vitais de camundongos	49
Tabela 2: Efeito do extrato etanólico Th-EtOH _f (2.000 mg/kg, v.o.) sobre os parâmetros bioquímicos na toxicidade aguda	50
Tabela 3: Efeito do extrato etanólico Th-EtOH _f na diarreia induzida por óleo de rícino em camundongos.....	54
Tabela 4: Efeito do extrato etanólico Th-EtOH _f sobre o <i>enteropooling</i> induzido por óleo de rícino em camundongos.	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- <i>Tocoyena hispidula</i> Standl.....	31
Figura 2- HPLC Analítico.....	36
Figura 3 - Representação esquemática do protocolo experimental de Toxicidade Aguda	37
Figura 4 – Representação esquemática do protocolo de diarreia induzida por óleo de rícino.....	39
Figura 5 - Representação esquemática do protocolo experimental de <i>Enteropooling</i>	40
Figura 6 – Representação esquemática do protocolo experimental de motilidade gástrica e modulação opióide.....	42
Figura 7 – Representação esquemática do protocolo experimental da modulação muscarínica.....	42
Figura 8 - Representação esquemática do protocolo experimental de esvaziamento gástrico.....	43
Figura 9 – Representação esquemática do protocolo de <i>enteropooling</i> induzida por PGE ₂	44
Figura 10- Perfil cromatográfico em HPLC analítico do extrato etanólico Th-EtOH _f	47
Figura 11- Espectro de absorção UV para as bandas com TR de 11,50 (a), 12,10 (b), 12,42 (c), 15,13 (d) e 17,62 (e) minutos, no cromatograma do extrato etanólico Th-EtOH _f	48
Figura 12- Secções histológicas do coração após a administração do extrato etanólico Th-EtOH _f (2.000 mg/kg, v.o).....	51
Figura 13- Secções histológicas do estômago após a administração do extrato etanólico Th-EtOH _f (2.000 mg/kg, v.o).....	51
Figura 14- Secções histológicas do fígado após a administração do extrato etanólico de Th-EtOH _f (2.000 mg/kg, v.o)	52
Figura 15- Secções histológicas do rim após a administração do extrato etanólico Th-EtOH _f (2.000 mg/kg, v.o).....	52
Figura 16- Secções histológicas do intestino após a administração do extrato etanólico Th-EtOH _f (2.000 mg/kg, v.o).....	53

Figura 17- Redução dos escores de severidade diarreica pelo extrato etanólico Th-EtOH _f em de modelo diarreia induzida por óleo de rícino em camundongos	53
Figura 18- Efeito do extrato etanólico Th-EtOH _f e sobre o enteropooling induzido por óleo de rícino em camundongos.....	55
Figura 19 - Atividade do extrato etanólico Th-EtOH _f no trânsito intestinal induzido por óleo de rícino em camundongos e modulação do sistema opióide	56
Figura 20 - Efeito do extrato etanólico Th-EtOH _f sobre o trânsito intestinal estimulado por betanecol em camundongos.....	57
Figura 21- Esvaziamento gástrico de camundongos tratados e não tratados com o extrato etanólico Th-EtOH _f	58
Figura 22 - Efeito do extrato etanólico Th-EtOH _f sobre o enteropooling induzido por PGE ₂ em camundongos.....	59
Figura 23 – Mapa conceitual do estudo da atividade antidiarreica do extrato etanólico Th-EtOH _f em camundongo.....	72

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AC	Adenilil ciclase
ACh	Acetilcolina
ADP	Adenosina Difosfato
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
AMPc	Monosfofato cíclico de adenosina
ARF6	Fator 6 de ribosilação ADP
ATR	Atropina
BET	Betanecol
Kir 3	Canais de potássio retificador de influxo de potássio
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CRTF	Canal Regulador de Condutância Transmembranar de Fibrose Cística
DAG	Diacilglicerol
DDA	Doença diarreica aguda
DC	Diarreia crônica
EP	Receptor de Prostaglandina E ₂
EPM	Erro padrão da média
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
FDA	Food and Drug Administration
Gi	Proteína G inibitória
Gq/11	Proteína G envolvida na ativação da fosfolipase C
IDSA	Sociedade de Doenças Infecciosas da América
ORS	Soluções de reidratação oral
PKC	Proteína quinase C
PIP₂	Bifosfato de Fosfatidilinositol
SGLTs	Transportadores de glicose dependentes de sódio
SESAPI	Secretaria de Saúde do Estado do Piauí
TRO	Terapia de Reidratação Oral
Th-EtOH_f	Extrato etanólico das folhas de <i>Tocoyena hispidula</i> Standl
UNICEF	Fundo das Nações Unidas para a Infância

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.2 Definição, etiologia, classificação e epidemiologia da diarreia.....	18
1.2.1 Tempo de evolução.....	19
1.2.1.1 Diarreia aguda/prolongada.....	19
1.2.1.2 Diarreia persistente	20
1.2.1.3 Diarreia crônica	20
1.2.2 Mecanismos fisiológicos	21
1.2.2.1 Diarreia osmótica	21
1.2.2.2 Diarreia secretora.....	22
1.2.2.3 Diarreia motora	22
1.2.2.4 Diarreia exsudativa	23
1.3 Tratamentos contra doenças diarreicas	23
1.3.1 Solução de reidratação oral	24
1.3.2 Fármacos opióides.....	25
1.3.3 Fármacos anticolinérgicos	26
1.3.4 Antimicrobianos.....	26
1.3.5 Probióticos	27
1.4 Plantas medicinais	28
1.5 Família Rubiaceae	29
1.6 Gênero <i>Tocoyena</i> e espécie <i>Tocoyena hispidula</i> Standl	29
2 OBJETIVOS	33
2.1 Objetivos gerais	33
2.2 Objetivos específicos:	33
3 MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 Fármacos e reagentes	35
3.2 Obtenção do extrato das folhas de <i>Tocoyena hispidula</i> Standl	35
3.3 Animais	35
3.4 Análise do extrato etanólico Th-EtOH _f em HPLC analítico	36
3.5 Ensaios farmacológicos	37
3.5.1 Estudo da toxicidade aguda extrato etanólico Th-EtOH _f	37
3.5.2 Avaliação da diarreia induzida por óleo de rícino em animais tratados com o extrato etanólico Th-EtOH _f	38
3.5.3 Acúmulo de fluido intestinal (<i>enteropooling</i>) induzido por óleo de rícino.....	39

SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispidula* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.

3.5.4 Avaliação da motilidade gastrointestinal	40
3.5.6 <i>Enteropooling</i> induzido por PGE ₂	44
3.6 Análise estatística	44
3.6.1 Análise estatística dos protocolos <i>in vivo</i>	45
4 RESULTADOS.....	47
4.1 Análise do extrato etanólico Th-EtOH _f em HPLC analítico.....	47
4.2 Resultados <i>in vivo</i>	49
4.2.1 Teste de toxicidade oral aguda	49
4.2.2 Escores de severidade e efeito do extrato etanólico Th-EtOH _f sobre a redução da diarreia induzida por óleo de rícino	53
4.2.3 Efeito do extrato etanólico Th-EtOH _f sobre a redução da diarreia induzida por óleo de rícino	54
4.2.4 Redução da geração de fluido intestinal pelo extrato etanólico Th-EtOH _f na diarreia induzida por óleo de rícino	54
4.2.5 Efeito do extrato etanólico Th-EtOH _f mediado pelo sistema opióide.....	56
4.2.6 Avaliação da participação da via muscarínica sobre o trânsito gastrointestinal de camundongos.....	57
4.2.7 Efeito do extrato etanólico Th-EtOH _f sobre o esvaziamento gástrico de camundongos	58
4.2.8 Efeito do extrato etanólico Th-EtOH _f sobre os parâmetros de diarreia causados por PGE ₂	58
5 DISCUSSÃO	61
6 CONCLUSÃO	71
PERSPECTIVAS	78
REFERÊNCIAS.....	76

SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispidula* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.

Introdução

SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispidula* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Definição, etiologia, classificação e epidemiologia da diarreia

A Sociedade de Doenças Infecciosas da América (IDSA) define a diarreia como “uma alteração do movimento intestinal normal”, a mesma é caracterizada pelo aumento no conteúdo de água, volume ou frequência de fezes (GUERRANT et al., 2001).

A diarreia possui etiologia multifatorial que pode ser atribuída a diversos fatores, dentre estes as disfunções na motilidade gastrointestinal, elevação da secreção de fluidos intestinais, agentes patogênicos (vírus, bactérias), toxinas (plantas e microrganismos) e medicamentos (antineoplásicos, antirretrovirais entre outros), os fármacos antineoplásicos em especial atuam provocando a irritação da mucosa intestinal causando uma desproporção entre a absorção e secreção no intestino, a diarreia é um dos maiores efeitos colaterais relatados durante o tratamento com esses medicamentos (ARNOLD et al., 2005; BEATTY et al. 2010).

A principal forma de transmissão das doenças diarreicas é fecal-oral, geralmente relacionada à contaminação de alimentos, fluidos, contato direto com pessoas contaminadas por toxinas ou bactérias; o homem, os alimentos e a água estão entre as principais fontes de enteropatógenos humanos (KELLY, 2011; PATEL; THILLAINAYAGAM, 2011).

A diarreia é uma das mais preocupantes causas de mortes em todo o mundo, sobretudo em crianças. No ano de 2010, a diarreia foi relatada como a responsável por 800 mil mortes em menores de cinco anos de idade. Em 2013, o Relatório de Progresso “Compromisso com a Sobrevivência Infantil: Uma promessa renovada” da UNICEF, descreveu que aproximadamente 1.600 crianças menores de cinco anos de idade morreram por causas diarreicas em todo o mundo (LIU, 2012; UNICEF et al., 2013).

O relatório de mortalidade infantil brasileiro de 2011, descreveu que 756 crianças menores de cinco anos foram a óbito por esta patologia, com 354 casos relatados na região nordeste do país, com 20 casos oriundos do Piauí (3º lugar com maior proporção de mortes do Nordeste) (BRASIL, 2012). No ano de 2013, a SESAPI (Secretaria de Saúde do Estado do Piauí) destacou 100 mil casos de diarreia, com 126 casos de óbitos notificados no Piauí nos anos de 2016 - 2018 foram notificados respectivamente 117,124, 40* (até abril) casos de óbitos por diarreia respectivamente

SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispidula* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.

tendo mais prevalência em idosos acima de 80 anos de idade (SESAPI, 2019a; SESAPI, 2019b).

As condições socioeconômicas como comportamentais e ecossistêmicas são fatores relevantes nas doenças diarreicas, a deficiência dos serviços de saneamento básico, o limitado acesso à água potável e uma higienização precária, contribuindo para o aumento da incidência e agravos que em sua maioria refletem no surgimento de surtos epidêmicos (HUMPHREY, 2009; BRANDT; ANTUNES; SILVA, 2015). Clinicamente a diarreia pode ser classificada como diarreia aguda, diarreia persistente e diarreia crônica (BENETT; DOLIN; BLASER, 2015).

1.1.1 Tempo de evolução

1.1.1.1 Diarreia aguda/prolongada

A doença diarreica aguda é definida como a passagem de mais de 250g de fezes por dia, podendo persistir por até duas semanas, pode apresentar três ou mais episódios diarreicos ao dia. É adquirida na maioria das vezes pela via fecal-oral e ingestão de água ou alimentos contendo patógenos (QI; TESTER, 2018), tem início imediato, característico de etiologia infecciosa; conforme a gravidade pode ser classificada em leve quando não há evidências de desidratação, moderada quando há manifestação de sinais de desidratação e grave quando há intenso quadro de desidratação, necessitando neste de terapia endovenosa (MATHAN, 1998; DINESEN; HARBORD, 2013; BRANDT; ANTUNES; SILVA, 2015).

A doença diarreica aguda também pode se manifestar após um período de viagem, sendo mais conhecida como diarreia do viajante. Não há diferença estatística em relação a homens e mulheres, é mais prevalente entre crianças, adolescentes e adultos jovens e uma predisposição genética tem sido relatada como um fator que pode influenciar no aparecimento. Até então o fator de maior risco é o destino da viagem como a Índia, Oriente Médio, Egito, África Central e a maioria dos países da América Central que apresentam maior incidência. A diarreia do viajante é caracterizada por três ou mais períodos diarreicos em 24 horas, acompanhados de cólicas intestinais, náuseas, vômitos, a maioria dos pacientes são curados espontaneamente em um período de 48 horas (BELDEROK et al., 2011; LALANI et al., 2015; STEFFEN, 2017; SANDERS et al., 2019). Há algumas formas de prevenção a diarreias do viajante, como o uso profilático da antibiótico terapia, dentre estes o uso

SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispidula* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.

da rifaximina é o mais prescrito, o uso de subsacilato de bismuto, também é bem recomendado, porém o seu uso deve ser realizado quatro vezes ao dia (ERICSSON, 2019).

Entre os maiores causadores da diarreia aguda estão os agentes virais: rotavírus, novovírus, astrovírus, adenovírus e calcivírus. Os agentes bacterianos mais comuns são: *Escherichia coli*, *Campylobacter* spp., *Salmonella enteritidis*, *Clostridium perfringens*, *Vibrio cholerae*, *Shigella* spp.; ingestão de toxinas por alimentos contaminados com *Bacillus cereus*, *Staphylococcus* ssp. ou de alimentos que não são absorvíveis pelo trato gastrointestinal: frutose, manitol e sorbitol, e medicamentos irritantes intestinais, dentre estes alguns antibióticos, antiácidos e antagonistas H₂ (HOLMGREN; LUNDGREN, 2018; TANDUKAR et al., 2019).

1.1.1.2 Diarreia persistente

A diarreia persistente dura em média mais de 14 dias, é uma causa comum de óbito, geralmente ocasionada por mais de um patógeno, pode ter origem bacteriana (*Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Yersinia*, *E. coli enterotoxigênica*, *Clostridium difficile*) e parasitaria (*Microsporidium*, *Isospora belli*, *Entamoeba histolytica*, *Strongyloides*, *Giardia*, *Cryptosporidium* e *Cyloporasão*), é mais incidente em crianças e adultos com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), pode ser resultante infecções recorrentes ou não tratadas e má digestão de lactose, aproximadamente 20% dos episódios de diarreia aguda resultam em persistente, em crianças pode ser de origem não infecciosa (doença celíaca, intolerância ao leite bovino e uma variedade de carboidratos, colite alérgica entre outros), alguns fatores são considerados de risco para a persistência diarreica entre eles a desnutrição e a ausência de aleitamento materno (OCHOA; SALAZAR-LINDO; CLEARY, 2004; KAMUCHAKI et al., 2013; RAO et al., 2014).

1.1.1.3 Diarreia crônica

A diarreia crônica é caracterizada pela ocorrência de três ou mais evacuações (volume de 200g em 24 horas) com permanência superior a quatro semanas, as fezes podem ser líquidas ou pastosas (FERNÁNDEZ-BANÑARES et al., 2016), estudos indicam que 1% a 5% da população sofre com diarreia crônica (SCHILLER; PARDI; SELLIN, 2017; QI; TESTER, 2018), está é considerada um sintoma característico de distúrbios gastrointestinais, dentre eles a síndrome do intestino irritável (LACY et al.,

SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispidula* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.

2016) a sintomatologia da diarreia crônica envolve falta de apetite, perda de peso, cansaço, fadiga, fezes pastosas e mole (LIU et al., 2017).

A doença diarreica crônica é classificada de acordo a patogenia causal, como esteatorreia (deficiências na absorção, distúrbios intestinais), osmótica (laxantes osmóticos, frutose), secretora (toxinas bacterianas), inflamatória (doenças do intestino inflamado, inflamações bacterianas) (FERNÁNDEZ-BANÑARES et al., 2016).

1.1.2 Mecanismos fisiológicos

O sistema nervoso entérico (SNE) atua no funcionamento do sistema gastrointestinal, é responsável pela alteração do potencial de ação da musculatura lisa intestinal (MCKAY; MACNAUGHTON, 2012). O mal funcionamento deste sistema está relacionado com o desencadeamento de várias patologias como a pseudo-obstrução neuropática. O SNE é dividido em plexo submucoso e plexo mioentérico, o primeiro é responsável pela absorção e secreção da mucosa do epitélio, e o segundo, presente na camada muscular do intestino, é importante no processo de motilidade intestinal tendo como principal função a regulação motora do intestino, quando degradado causa desregulação peristáltica e extensão do lúmen intestinal, desencadeando diversas patologias de motilidade dentre estas a diarreia (LI et al., 2016; KOPKE; RUAUX; GAL, 2018).

1.1.2.1 Diarreia osmótica

A osmolalidade é uma propriedade que interfere na microbiota bacteriana, é conhecida como a quantidade de soluto em uma solução. No homem, a osmolalidade é dirigida pelo sistema sanguíneo, apresentando variância gastrointestinal, devido a absorção de água pelas células epiteliais e secreção luminal (BURG; FERRARIS, 2008).

A diarreia osmótica pode ocorrer por diversos fatores, dentre eles a pancreatite, doença celíaca e intolerância a lactose podendo também ser induzida por laxantes osmóticos, estes obtiveram crescimento em sua comercialização ao longo dos tempos, sendo muito utilizados erroneamente para o controle de peso, gerando muitas vezes casos de diarreia crônica, resultando na incapacidade de absorção no epitélio de grandes quantidades de soluto (sais) bem como de alguns compostos específicos (polietilenoglicol), uma vez que a água é transportada por osmose do

SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispidula* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.

epitélio intestinal em direção ao lúmen, gerando o aumento da motilidade intestinal e minimizando a consistência das fezes (ROERIG et al., 2010; TROPINI et al., 2018).

A inadequação osmótica hidroeletrólítica no intestino pode agravar-se quando o indivíduo apresenta o quadro de desidratação, podendo acarretar em hipovolemia, choque e morte. Caso não seja revertido rapidamente, a desidratação pode ocasionar atrofia das vilosidades intestinais, minimizando a velocidade de absorção de nutrientes, uma vez não absorvidos estes promoverão osmose de água em direção ao lúmen intestinal (LÉODIDO, 2017).

1.1.2.2 Diarreia secretora

Os indivíduos que superam esta patologia geralmente lidam com consequências destas desenvolvidas a longo prazo, como por exemplo, maior predisposição a infecções, desenvolvimento mental tardio, bem como desnutrição. Causada por estímulos capazes de mudar o transporte de íons através do epitélio de revestimento o qual começa a inocular maior quantidade de água, resultando na elevação da secreção de Cl^- e diminuição da absorção de Na^+ e Cl^- , a diarreia secretora é a segunda maior causa de morte o mundo, atingindo mais frequentemente crianças (mortalidade infantil mediada em 580.000) com maior índice em países com renda em crescimento. (THIAGARAJAH et al., 2015; GRIGGS et al., 2016).

A diarreia secretora pode ser de origem infecciosa ou não-infecciosa, a de origem infecciosa é ocasionada por toxinas de origem bacteriana (*Vibrio cholerae*, *rotavirus*, *Escherichia coli* enterotóxica e algumas bactérias enteroinvasivas). As toxinas de origem bacteriana são capazes de causar a elevação dos níveis de AMPc, GMPc ou Cálcio intracelular, causando a abertura de canais que regulam a condutância transmembranar (CFTR) localizados na membrana apical, ativados mediante a proteínas quinases causando o aumento na secreção de cloro e inibição da absorção de sódio e cloro no intestino (SOUSA, 2016; LEÓDIDO, 2017).

1.1.2.3 Diarreia motora

A diarreia motora é originada a partir do desequilíbrio da motilidade gastrointestinal, oriundos de inflamações no intestino, hipertireoidismo, o uso de alguns fármacos (antineoplásicos/ opiáceos), toxinas, reações pós cirúrgicas de vagotomia e gastrectomia, que em sua maioria causam a elevação da motilidade intestinal,

SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispidula* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.

resultando em uma má absorção de água e em uma diminuição do período de digestão (KENT; BANKS, 2010).

1.1.2.4 Diarreia exsudativa

Lesões na região intestinal podem levar a diarreia de cunho inflamatório, podendo ocasionar a elevação da secreção com sinais de hematoquezia (sangue nas fezes), perda de proteínas e muco. A diarreia inflamatória pode ser ocasionada por patologias inflamatórias que atingem o intestino como a Doença de Crohn, neoplasias e infecções por *Salmonella*, *Campylobacter*, *Entamoeba histolytica*, *Escherichia coli*, estas podem originar hemorragias intestinas, inflamação e ulceração (GALE; WILSON, 2016).

Além destes podem ser de origem viral mais comumente por Rota vírus e Novovírus, que reduzem a absorção de fluidos e eletrólitos, sua sintomatologia inclui náuseas e vômito, febre, desequilíbrio eletrolítico podendo levar ao óbito, o uso de alguns medicamentos como os quimioterápicos e antibióticos, também podem levar a patologia (HAMMER; MCPHEE, 2016).

1.3 Tratamentos para doenças diarreicas

Para uma melhor abordagem acerca do tratamento clínico dos diversos quadros diarreicos, faz-se necessária a avaliação etiológica, clínica, bem como o histórico do paciente e, se necessários, exames confirmatórios (GALE; WILSON, 2016).

A Organização Mundial de Saúde preconiza a Terapia de Reidratação Oral (TRO) como o tratamento clínico para diarreia, porém, este tratamento não minimiza significativamente a frequência da saída das fezes e o tempo de duração diarreica. Durante episódios diarreicos infantis a OMS recomenda a ingestão de zinco 20 mg por dia em associação com a TRO no período de 10 a 14 dias para minimização dos malefícios causados pela diarreia (BARFFOUR et al., 2018).

Os níveis homeostáticos de zinco são determinados pela ingestão, absorção e as perdas. Crianças com quadro de diarreia aguda tendem a apresentar diminuição dos níveis de zinco. Um estudo realizado por Passariello et al. (2011) mostra o potencial benéfico da suplementação do zinco na terapêutica da diarreia em crianças,

SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispidula* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.

outros estudos sobre o envolvimento do zinco em quadros de diarreia em adultos ainda estão sendo realizados (LUKACIK et al., 2008; DONOWITZ, 2012).

1.3.1 Solução de reidratação oral

Desenvolvida em 1970 a Solução de Reidratação Oral (SRO), teve como objetivo inicial minimizar os efeitos de desidratação e acidose metabólica ocasionados por casos de diarreia aguda de origem infecciosa (SCHULTZ; CURRAN, 1970). A SRO inicialmente era composta por 90 mM de Sódio, 111 mM de glicose, com osmolaridade de 311 mOsm. Com essa composição da SRO teve efeitos benéficos na desidratação, todavia não minimizou a quantidade e volume das fezes, para isso decorreu-se uma série de modificações para o melhoramento de suas ações no organismo (BINDER et al., 2014).

O tratamento com a Solução de Reidratação Oral, estabelecida pela Organização Mundial de Saúde, pode minimizar a mortalidade diarreica em 93 % (MUNOS; FISCHER-WALKER; BLACK, 2010) atuando na melhora do quadro diarreico. Sua ação consiste na elevação da absorção de sódio e água através do transporte passivo, para isso os níveis de sódio na SRO devem ser equivalentes a 75 mmol/L, glicose a 75 mmol/L com um total de 247 Osm/L de osmolaridade total da solução (CARMO et al., 2012).

A prescrição para o uso da SRO varia conforme o grau de desidratação do paciente. Durante a desidratação leve, onde se há a perda de peso corpóreo equivalente à 3 a 5 % é recomendável a ingestão de 50 mL/kg, em casos de desidratação moderada, caracterizada pela perda de peso que varia entre 6 a 9% é necessário a ingestão do dobro do volume recomendado na desidratação leve sendo este, portanto de 100 mL/kg, já na desidratação severa com índice de perda de peso corpóreo superiores a 10%, é necessário concomitante à terapia de SRO (100 mL/kg) a infusão intravenosa de fluidos (NEGREIROS, 2018).

A Terapia de Reidratação Oral age apenas como um tratamento auxiliar na reabilitação do paciente e por ser de fácil acesso e manipulação é bem aceita no tratamento, porém não é suficiente para promover a total cura. É importante salientar que o seu uso apresenta algumas restrições, podendo acarretar esporadicamente alguns casos de hiponatremia sintomática; em casos de choque hipovolêmico infantil não é indicada, uma vez que a administração pode acarretar em prejuízos aos reflexos

SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispidula* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.

de proteção das vias aéreas (KING et al., 2013; FRANCESCHI et al., 2014; COSTA, 2016).

1.3.2 Fármacos opióides

Os peptídeos opióides (encefalina, endorfinas, dinorfina) produzidos e liberados pelos neurônios entéricos, atuam de maneira crucial na regulação da sinalização gastrointestinal, levando a conformações na motilidade, transferência de eletrólitos e fluidos. A ligação a receptores opióides no trato gastrointestinal diminui o trânsito colônico intestinal ocasionando a conexão inibitória do nervo entérico, o pré-bloqueio sináptico e pós-sináptico e a liberação de neurotransmissores. Os canais de Cl^- a nível epitelial podem ser ativados mediante aos neurônios secretomotores, gerando a perda osmótica de água em direção ao lúmen intestinal, os fármacos opióides, quando se ligam a estes neurônios secretomotores geram a hiperpolarização, resultando na saída de fezes duras (PANNEMANS; CORSETTI, 2018).

A loperamida fármaco opióide da classe das piperidinas, destaca-se por ser de fácil acesso a população, trata-se de um, muito utilizado por décadas para casos de diarreia aguda e crônica, atua inibindo o peristaltismo e a secreção gastrointestinal, diminui a urgência fecal e aumenta o tônus anal. A loperamida é um agonista dos receptores μ -opióide acoplado a proteína G (G_i), ao ligar-se ao seu respectivo receptor causa a separação das subunidades α e $\beta\gamma$ acarretando a inibição da Adenil ciclase (AC) e conseqüentemente do AMPc (REGNARD et al., 2011).

Os canais de cálcio dependentes de voltagem se fecham diminuindo a concentração intracelular de cálcio, provocando a inibição da calmodulina. A hiperpolarização celular pela abertura dos canais de potássio retificador de influxo ($\text{Kir}3$), resulta na diminuição da excitação e ocasiona o relaxamento do músculo liso, elevando a reabsorção de fluidos e sódio intestinal. Porém, o uso prolongado deste medicamento pode causar a megacolon, que se caracteriza pela dilatação do intestino, causada pela inibição da motilidade e retardamento do trânsito intestinal e não deve ser utilizado quando a diarreia for bacteriana (EGGLESTON; CLARK; MARRAFFA, 2017).

SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispidula* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.

1.3.3 Fármacos anticolinérgicos

O trato gastrointestinal apresenta mais receptores muscarínicos, em especial o tipo M₃, estes receptores estão acoplados a proteína G (Gq/G11). A acetilcolina é um neurotransmissor, que liga-se ao receptor muscarínico M₃, provocando a separação das subunidades α e $\beta\gamma$ da proteína Gq, que ativam a fosfolipase C, esta por sua vez quebra os fosfolipídios de membrana formando bisfosfato de fosfatidilinositol (PIP₂) e diacilglicerol (DAG), após a clivagem dá-se início então a conversão de PIP₂ em IP₃ (trisfosfato de inositol), este por sua vez liga-se ao receptor presente na membrana do retículo sarcoplasmático, desta forma há a abertura dos canais de cálcio, resultando na saída de cálcio das reservas intracelulares em direção ao citoplasma (UWADA et al., 2017).

A elevação de Ca²⁺ gera a ativação do receptor de rianodina presente no retículo sarcoplasmático, causando dinamicamente o aumento crescente dos níveis de Ca²⁺, como resultante final há então a contração da musculatura lisa, o DAG continua ancorado membrana plasmática, uma vez que é estruturalmente hidrofóbico, este ativa então a Proteína quinase C (PKG), que atua fosforilando canais iônicos. Os receptores muscarínicos (M₃) se bloqueados, leva à redução da liberação de Ca²⁺, resultando na diminuição da motilidade gastrointestinal (MARSANGO et al., 2018).

Os antagonistas dos receptores muscarínicos, também conhecidos como fármacos anticolinérgicos, impedem a ligação da acetilcolina (neurotransmissor) ao receptor muscarínico (tipo M₃) acoplado a proteína G (Gq), dessa forma reduzem a secreção e a motilidade intestinal. São muito prescritos no alívio dos sintomas diarreicos e cólicas intestinais, dentre os mais utilizados destacamos a escopolamina (BUSCOPAN®) e atropina (ATROPIN®), presente em diversas formas farmacêuticas (SOUSA, 2016; MENOZZI et al., 2017).

1.3.4 Antimicrobianos

Em casos onde há uma identificação laboratorial do patógeno a antibióticoterapia é recomendada, bem como em áreas endêmicas ou suspeita sintomática de diarreia dos viajantes, é necessário que seja feita uma cuidadosa análise a respeito da resistência do microrganismo para determinado antibiótico (COSTA, 2016), visto que os antibióticos quase que em sua totalidade estão envolvidos na infecção por *Clostridium difficile*, em especial o uso das cefalosporinas

SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispidula* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.

de terceira geração, como por exemplo, a clindamicina e flouroquinolonas (CANÇADO et al., 2018).

Na diarreia infecciosa ocasionada por *Vibrio cholerae*, *Aeromonas* sp, *Campylobacter* sp, os antibióticos são indicados, no entanto, o uso da terapia é limitada pela incapacidade de inibir de forma direta toxinas bacterianas, podendo em alguns casos pode ocasionar resistência bacteriana, para evitar é necessário que haja a confirmação de sensibilidade da cepa ao antibiótico a ser utilizado (SOUSA, 2016).

A azitromicina e o ciprofloxacino são os antibióticos mais prescritos, por serem de baixo custo, bem como seu menor risco em produzir resistência bacteriana, com boa biodisponibilidade, o primeiro trata-se de um macrolideo, que atua inibindo a síntese proteica, ao ligar-se reversivelmente a porção 50S ribossomal, o segundo pertence à classe das quinolonas, que agem inibindo as enzimas bacterianas (DNA topoisomerase II/ IV), prescritos em doses únicas e seriadas (COSTA, 2016).

1.3.5 Probióticos

O uso de probióticos produzem uma série de benefícios ao sistema gastrointestinal, agindo na diminuição da intolerância à lactose, bem como redução da sintomatologia da doença do intestino irritável, instigação do sistema imunológico, minimização da diarreia gerada por antibióticos e redução do rotavírus. De acordo com a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) e a OMS, os probióticos tratam-se de organismos microscópicos viáveis que ao serem veiculados em quantidades recomendadas ($>10^6$ – 10^7 UFC/g de produto administrado) podem agir de forma a conferir benefícios a saúde do homem (SOUKOUL et al., 2017); seu mecanismo de ação compreende a liberação de substâncias que inibem o crescimento do patógeno, competindo com os organismos microscópicos da flora intestinal. Dentre os probióticos mais utilizados e pesquisados estão os *Lactobacillus* sp, *Bifidobacterium* sp e *Saccharomyces boulardii* (NEGRUEIROS, 2018).

A garantia da viabilidade probiótica deve-se a tecnologia anidrobiótica, que permite que células vivas sejam colocadas em matrizes com baixa umidade permitindo assim sua encapsulação (TRIPATHI et al., 2014), as pesquisas envolvendo a utilização de biopolímeros de camada fina plastificada (filmes comestíveis) neste mesmo sentido tem crescido ao longo dos anos, bem como seus prós e contra, entre os benefícios citados na literatura está a capacidade de estabilizar a integridade

SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispidula* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.

estrutural dos alimentos, oriundo do inserimento de probióticos, um dos pontos críticos desta inclusão está na letalidade bacteriana que pode ser gerada pela falta de capacidade dos biopolímeros em inativar a atividade do metabolismo celular, como forma de tentar suprir esta letalidade estudos com a inclusão de substâncias capazes de promover a eliminação de radicais livres, tem sido propostos (BURGAIN et al., 2013; SOUKOULIS et al., 2016).

1.4 Plantas medicinais

As plantas medicinais contribuem para o desenvolvimento de fórmulas farmacêuticas por meio de seus metabólitos secundários que atuam de forma direta ou indireta no organismo (FIRMO et al., 2011) sendo muito utilizadas em comunidades tradicionais como remédios caseiros, e conceituadas como produto de planta que ao ser administradas em animal ou no homem, desempenha alguma ação terapêutica (MURUGESAN et al., 2019). A utilização de plantas para fins medicinais tem crescido ao longo dos tempos, sendo incentivada pela OMS por sua acessibilidade econômica a grande parte da população, estimada em 80%, em países em desenvolvimento (SPRINGFIELD, et al., 2005, GALDINO, et al., 2012, SOUZA, et al., 2013).

Dotado de uma das maiores biodiversidades do planeta, o Brasil é rico em fauna e flora, com ampla variedade de herbárias com potencial terapêutico, tendo a fitoterapia como uma opção medicamentosa, abrangendo o atendimento primário a saúde (SOUZA-MOREIRA et al., 2010, MESSIAS et al., 2015). O uso frequente das herbárias trouxe grande visibilidade, despertando a curiosidade e interesse da comunidade científica, que tem realizado muitos estudos de cunho observativo e experimental para comprovação de efeitos farmacológicos (SIANNI et al., 2005).

O Governo Federal do Brasil em 2006 aprovou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos com o intuito de direcionar e firmar as pesquisas desenvolvidas (BRASIL, 2006). O Ministério da Saúde divulgou uma lista constando 71 espécies de vegetais com potencial farmacológico comprovados para a formulação de novos fármacos, surgindo desta forma a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do Sistema Único de Saúde (RENISUS) (BRASIL, 2009).

A extensão das pesquisas envolvendo fitoterápicos, deve-se sobretudo devido ao alto custo dos medicamentos de origem sintética, a incidência de efeitos colaterais, e a dificuldade de acesso da população aos serviços médicos, ao crescimento do

SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispidula* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.

conhecimento químico e farmacológico das plantas medicinais e seus derivados ativos, contudo, alguns aspectos devem ser criteriosamente observados, dentre estes as informações sobre a eficácia e segurança destes compostos que devem ser criteriosamente analisados através de levantamentos etnofarmacológicos, artigos de cunho científico oriundos de estudos clínicos e pré-clínicos (VANACLOCHA; CAÑHIGUERAR, 2003).

1.5 Família Rubiaceae

A família Rubiaceae, composta por 650 gêneros e 13.000 espécies, possui três subfamílias: Rubioideae, Cinchonoideae e Ixoroideae, e esta família tornou-se de grande importância econômica com utilização na indústria alimentícia e farmacêutica, cerca de 40 espécies de Rubiaceae são utilizadas na medicina popular, são muito conhecidas no meio científico pelos seus constituintes fitoquímicos dentre estes os triterpenoides, saponinas, diterpenoides, esteroides, cumarinas, flavonoides, liganas, derivados fenólicos e taninos (MARTINS; NUNES, 2015; SOUSA et al., 2018).

Entre as espécies da família Rubiaceae, existem algumas de muita importância econômica, dentre estas *Coffea arabica* L. e *Genipa americana* L. (indústria alimentícia), *Ixora* ssp., *Mussaenda* spp., *Gardenia* ssp (ornamentais) (STRUWE, 2002; COELHO; AGRA; BARBOSA, 2006). Estudos realizados com algumas espécies de plantas da família Rubiaceae entre estas *Canthium* sp., *Cinchona pubescens* Vahl, *Chiococa alba* Hitchc, *Chiococa brachiata* Ruiz, *Cinchona calisaya* Wedd, *Genipa americana* L., *Gonzalagunia rósea* Standl, *Hamelia patens* Jacq., *Mitracarpus frigidus* K. Schum, *Morinda citriflora* L., *Palicourea longiflora* Aubl., *Psychotria carthagenensis* Jaq., *Psychotria ipecacuanha* Stokes, *Psychotria leiocarpa* Chan. & Schltl demonstraram muitas atividades farmacológicas dentre elas antibacteriana, antiasmática, analgésica, emética, diurética, antiarrítmica, antiulcerogênica, antidiarreica, antigonorreica, antiinflamatória, antioxidante, antifúngica, antirreumática, leishmanicida, antitumoral, ansiolítica e anticonvulsivante (SOUSA et al., 2013).

1.6 Gênero *Tocoyena* e espécie *Tocoyena hispidula* Standl

O gênero *Tocoyena* ocorre na região neotropical é composta por 30 espécies de árvores de porte pequeno aproximadamente 12 espécies são registradas no Brasil,

SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispidula* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.

com distribuição em todas as regiões (DELPETE; JARDIM,2012; OLIVEIRA, 2015). Algumas plantas do gênero *Tocoyena* possuem indicação de uso medicinal entre elas *Tocoyena brasiliensis* Mart., *Tocoyena formosa* (Cham. & Schltl.), *Tocoyena guianensis* Kunt., *Tocoyena sellowiana* (Cham. & Schltl.) K.Schum usadas popularmente no tratamento de queimaduras, reumatismo, tosse, torção, cistite, reumatismo, problemas renais, cardíacos, contusões e luxações (Souza et al., 2013).

A *Tocoyena hispidula* Standl. é conhecida popularmente como “flor-do-cerrado” e “angelca”, podendo ser localizada nas regiões Norte e Nordeste. No Piauí, a *Tocoyena hispidula* Standl. é encontrada no município de Campo Maior usada popularmente no tratamento de dor abdominal e inflamação do útero (FARIAS et al., 2004; SILVA et al., 2015) (Figura 1).

Um grupo de pesquisadores da Universidade Federal do Piauí (UFPI) no ano de 2018, ao realizar o isolamento e identificação estrutural de constituintes químicos da fração cloroformica do extrato etanólico do caule da *Tocoyena hispidula*, e obtiveram como resultado seis compostos puros (lupenona, ácido acetiloleanólico, lapachol, chidolinato de metila, morindolídeo) e quatro misturas de isoprenoides, encontrando predominantemente triterpenoides e esteroides, o mesmo grupo de pesquisadores também buscou avaliar a atividade antileishmania dos extratos, frações e compostos frente a promastigotas de *Leishmania major* e verificaram que o extrato etanólico, a fração clorofórmica (CHCl₃), acetato de etila (AcOEt) e metanólica (MeOH) e os compostos chelidonato de metila e 11- noriridoide inibiram o crescimento de *L. major*, sendo as frações CHCl₃ e AcOEt mais efetivas que as demais (SOUSA et al., 2018).

A casca do caule de *Tocoyena hispidula* Standl. foi inicialmente testada frente as disfunções de motilidade e não apresentou resultados significativos, o extrato etanólico das folhas de *Tocoyena hispidula* Standl, ainda não possui estudos frente as disfunções diarreicas, visto que é imprescindível a realização de pesquisas na área para implementação de terapias com melhores efeitos farmacológicos e menos efeitos adversos, esta dissertação teve por objetivo a investigação do efeito do extrato etanólico das folhas de *Tocoyena hispidula* Standl em modelos de diarreia aguda.

SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispidula* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.

Figura 1- *Tocoyena hispidula* Standl



Fonte: Bióloga Ruth Raquel Soares de Faria, 2015

SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispidula* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.

Objetivos

SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispidula* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- ✓ Investigar o potencial antidiarreico do extrato etanólico das folhas de *Tocoyena hispidula* Standl em modelos de diarreia experimental em camundongos.

2.2 Objetivos específicos:

- ✓ Avaliar o potencial toxicológico do extrato etanólico (Th-EtOH_f) das folhas de *Tocoyena hispidula* Standl. em camundongos;
- ✓ Analisar um possível efeito antidiarreico do extrato etanólico Th-EtOH_f no modelo de diarreia induzida por óleo de rícino e no esvaziamento gástrico em camundongos;
- ✓ Avaliar o efeito antidiarreico do extrato etanólico Th-EtOH_f no modelo de *enteropooling* induzido por PGE₂ em camundongos;
- ✓ Investigar se o extrato etanólico Th-EtOH_f possui efeito inibitório no trânsito gastrointestinal;
- ✓ Avaliar a participação da via opióide e ou muscarínica no efeito observado do extrato etanólico Th-EtOH_f.

SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispidula* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.

Metodologias

SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispidula* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Fármacos e reagentes

Durante a pesquisa, foram utilizados óleo de rícino, prostaglandina E₂ (PGE₂), sulfato de atropina, cloridrato de betanecol, obtidos da Sigma Chemical Company, St. LOUIS. cloridrato de loperamida e cloridrato de naloxona, obtidos da Janssen-Cilag Farmacêuticals LTDA, Brasil e CRISTÁLIA Pharmaceutical Chemicals LTDA, Brasil, respectivamente. Os outros produtos químicos e reagentes empregados durante a pesquisa eram de grau analítico e obtidos a partir de fornecedores comerciais padrão. Todas as drogas foram dissolvidas em solução tampão fosfato-salina (PBS) ou solução salina.

3.2 Obtenção do extrato das folhas de *Tocoyena hispidula* Standl

As folhas da *Tocoyena hispidula* Standl foram coletadas na Fazenda Lourdes (S 04° 51' 32,4" W 42° 03' 42,9" altitude: 154 m) no município de Jatobá do Piauí em 31 de maio de 2015. O material vegetal foi identificado pela botânica Dra Ruth Raquel Soares de Farias. A exsicata foi depositada no Herbário Graziella Barroso da Universidade Federal do Piauí (UFPI) sob n.º ICN TEPB 30.572.

Para obtenção do extrato etanólico as folhas foram secas à temperatura ambiente e submetidas extração exaustiva com etanol a 95% em temperatura ambiente, com três dias de duração para cada extração. A cada extração, a solução hidroalcoólica resultante foi filtrada em papel filtro e concentrada por rotoevaporação a temperatura de 45°C e pressão reduzida e, posteriormente, congelada e liofilizada obtendo-se 78,22 gramas (15,5%) do extrato etanólico bruto (Th-EtOH_r), foi armazenado em um refrigerador.

O extrato (Th-EtOH_r) das folhas da *Tocoyena hispidula* Standl e utilizados nesse estudo foram gentilmente fornecidos pelo grupo de pesquisa coordenado pela Profa. Dra. Mariana Helena Chaves do Laboratório de Química Orgânica do Departamento de Química da Universidade Federal do Piauí.

3.3 Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss* (pesando de 25 a 30g), machos e fêmeas, provenientes do Biotério setorial da Universidade Federal do Piauí /UFPI, mantidos sob condições controladas de temperatura (22 ± 2° C), ciclo claro-escuro de

SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispidula* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.

12 horas e livre acesso a água. Os animais foram privados de alimentação por cerca de 18 horas antes dos experimentos para avaliação antidiarreica. Todos os experimentos desenvolvidos neste estudo foram submetidos previamente ao Comitê de Ética em Experimentação Animais da UFPI (CEEA/UFPI) sob o número de protocolo 440/18. Os procedimentos referentes à eutanásia dos animais foram realizados em conformidade com a resolução do Conselho Federal de Medicina Veterinária Nº 1000 de 2012.

3.4 Análise do extrato etanólico Th-EtOH_r em HPLC analítico

O extrato etanólico Th-EtOH_r foi analisado em HPLC analítico para obtenção do perfil cromatográfico. Na etapa de preparo da amostra, uma alíquota de 10 mg do extrato foi dissolvida em 1,0 mL de MeOH e aplicada em cartucho de extração em fase sólida C-18, eluída com 6 mL de MeOH. Após evaporação do solvente, a amostra foi solubilizada em MeOH/H₂O (1:1) e filtrada em membrana com porosidade de 0,45 µm, obtendo-se a concentração de 5 mg x mL⁻¹.

O volume de 10 µL da amostra foi injetado no HPLC, usando gradiente exploratório de MeOH-Acetonitrila (ACN) 1:1 e H₂O com 0,2% de AcOH (5% → 100% em 40 min), com fluxo de 1 mL min⁻¹ e comprimento de onda de 200 - 800 nm. A Figura 2 mostra o aparelho de cromatografia.

As análises em HPLC analítico foram realizadas em cromatógrafo da Shimadzu equipado com degaseificador DGU-20A5R, bomba LC-20AT, válvula LPGE kit, injetor SIL-20AHT, forno CTO-20A, detector DAD SPD-M20A, controlador CBM20A, coluna da Shimadzu modelo CL-ODS (M) com fase estacionária de sílica ligada C-18, (250 × 4,6 mm, 5 µm), com pré coluna C-18 Shim-pack 6-SIL, utilizado o software Shimadzu Lab Solutions.

Figura 2 - HPLC Analítico



SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispidula* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.

Fonte: Arquivo do Laboratório de Produtos Naturais/Departamento de Química - UFPI

3.5 Ensaios farmacológicos

3.5.1 Estudo da toxicidade aguda do extrato etanólico Th-EtOH_f

Os camundongos receberam o tratamento por via oral com o extrato etanólico Th-EtOH_f (2000 mg/kg) e salina 0,9 % (2,5 mL/kg) em seguida foram observados por 30 minutos após o tratamento e constantemente durante as primeiras 24 horas, com atenção especial nas primeiras 4 horas e diariamente por 14 dias.

O número total de mortos em cada grupo foi quantificado para o cálculo da DL₅₀ (concentração letal para 50% dos animais). Os sintomas de doenças bem como comportamento fora do padrão normal foram considerados e os sinais de toxicidade foram avaliados conforme a OECD 423/ 2001 (tremores/ convulsão/ diarreia, agitação entre outros), o peso corporal dos animais foram avaliados durante todos os dias, após o período de observação (14 dias) os animais foram anestesiados com cetamina (60 mg/kg) e xilazina (5 mg / kg) administrados em associação via peritoneal, amostras de sangue foram coletadas por punção retro orbital em seguida os animais foram eutanasiados e os órgãos (coração, rim, fígado, intestino, pulmão, estômago) foram removidos afim de verificar características de toxicidade macroscópicas e microscópicas.

Para a análise histológica, os órgãos acima mencionados foram fixados em álcool, clarificados em xileno e banhados em parafina e tamponados em formalina a 10 %. Após a fixação, os respectivos órgãos receberam cortes graduados em secções de 5 µm e corados com hematoxilina- eosina e analisados em microscópio.

Figura 3 - Representação esquemática do protocolo experimental de Toxicidade Aguda



SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispidula* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.

3.5.2 Avaliação do efeito do extrato etanólico Th-EtOH_f em modelos de diarreia induzida por óleo de rícino em camundongos

O grupo experimental foi composto por camundongos *Swiss* (pesando de 25 a 30g), provenientes do Biotério Setorial. O método utilizado foi descrito por Awouters et al. (1993) e por Costa et al. (2016), com algumas modificações, para a indução de diarreia por óleo de rícino, os animais permaneceram sob condições mencionadas anteriormente. Os camundongos foram divididos em grupos contendo 6 animais (figura 5), cada grupo recebeu seu tratamento com o fármaco padrão (loperamida), substância testada (Th-EtOH_f), ou veículo. Após 1h a diarreia foi induzida nos grupos experimentais por administração do óleo de rícino (10 mL/kg, v.o.).

Após a indução, foi observada a ocorrência de fezes diarreicas caracterizadas como fezes aquosas ou não formadas. Os animais foram alojados em gaiolas contendo papel absorvente e a observação foi realizada durante 4h, sendo avaliadas a massa total de fezes (mg) e o número total de fezes diarreicas que foram excretados por cada grupo durante este intervalo.

A partir da utilização do método de DiCarlo et al. (1994), foi avaliada a severidade da diarreia induzida por óleo de rícino, na qual realizou-se a análise de acordo com uma pontuação baseada na consistência das fezes. Assim foram atribuídos os seguintes escores: fezes normais (ou falta de diarreia) = 0, fezes semi-sólidas = 1, fezes pastosas/ fezes em pequena/moderada quantidade = 2, fezes aquosas/fezes em grande quantidade = 3.

Em cada tratamento foi observada a sua atividade e esta foi expressa como percentagem de inibição (%) da diarreia, sendo que o resultado do grupo controle foi estimado como 100%. O cálculo que foi realizado para avaliar a porcentagem de inibição da defecação e diarreia consiste:

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

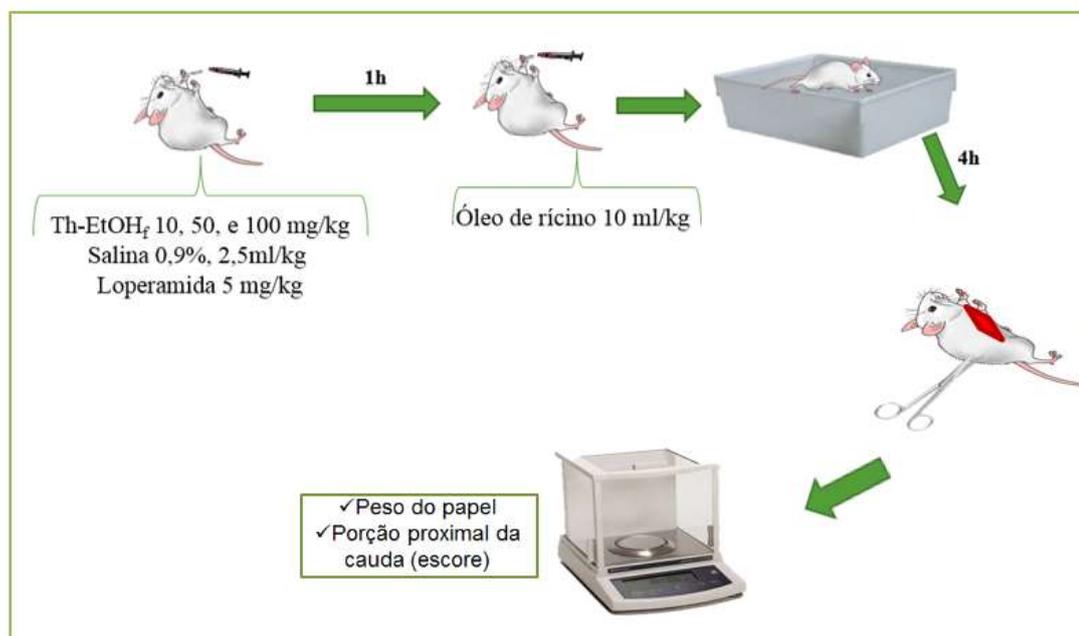
Onde:

A = significa a massa média de defecação provocada por óleo de rícino;

B = indica a massa média de defecação depois do tratamento com drogas ou a substancia em estudo (Th-EtOH_f).

SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispidula* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.

Figura 4 – Representação esquemática do protocolo de diarreia induzida por óleo de rícino.



3.5.3 Avaliação do efeito do extrato etanólico Th-EtOH_f no acúmulo de fluido intestinal (*enteropooling*) induzido por óleo de rícino

Neste protocolo foram utilizados camundongos *Swiss* (pesando de 25 a 30 g), sendo cada grupo composto por um n=6 animais (figura 6). O ensaio de *enteropooling* induzido por óleo de rícino foi realizado seguindo a metodologia descrita por Robert et al. (1976) e por Costa et al. (2016), com algumas modificações, onde os animais permaneceram em jejum de 18 horas antes do experimento. O ensaio iniciou com o pré-tratamento com Th-EtOH_f (10; 50; 100 mg/kg) ou loperamida (5 mg/kg, v.o.), enquanto o grupo veículo recebeu apenas a solução de NaCl 0,9% (2,5 mL/kg, v.o.) e após 1h realizou-se a indução de diarreia por óleo de rícino (10 mL/kg, v.o.).

Decorrido o período de 4h, os animais foram eutanasiados e o conteúdo intestinal relativo a porção do piloro ao ceco foi colocado em tubo graduado e a avaliação da porcentagem de inibição da secreção de fluido intestinal prosseguiu da seguinte forma:

$$\% \text{ Inibição do volume intestinal} = [(A - B) / A] \times 100$$

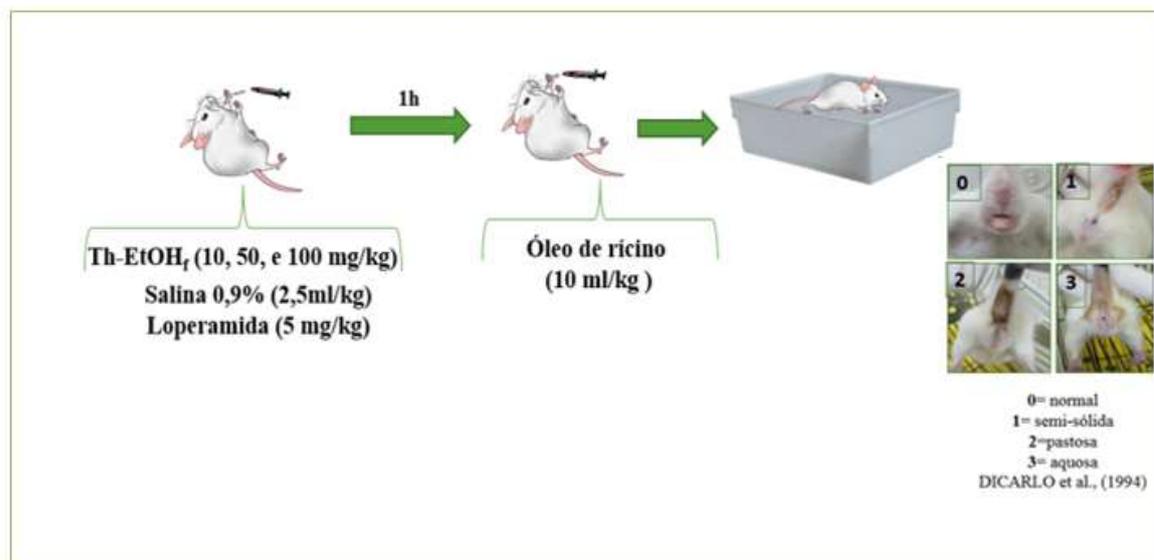
Onde:

A = significa o valor da secreção de fluido intestinal provocada por óleo de rícino;

SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispidula* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.

B = indica o valor da secreção de fluido intestinal após o tratamento com a droga padrão ou substância em estudo (Th-EtOH_f).

Figura 5 - Representação esquemática do protocolo experimental de *enteropooling*



3.5.4 Avaliação do efeito do extrato etanólico Th-EtOH_f na motilidade gastrointestinal

Através da utilização do método descrito por DiCarlo et al. (1994), com algumas modificações, foi avaliado o efeito do extrato etanólico Th-EtOH_f sobre o trânsito gastrointestinal, por meio da utilização de uma refeição de carvão como marcador da distância percorrida durante o trânsito. O presente protocolo foi dividido em três etapas, que foram realizadas separadamente, para verificar se há envolvimento do sistema opióide ou muscarínica na resposta do o extrato etanólico Th-EtOH_f na redução da motilidade gastrointestinal. Deste protocolo em diante, foi utilizada a melhor dose do extrato etanólico Th-EtOH_f obtida no protocolo de *enteropooling*, que foi de 50 mg/kg.

Na primeira etapa do experimento, foi avaliado o efeito da substancia testada na redução do trânsito gastrointestinal no modelo de diarreia induzida por óleo de rícino. Primeiramente, foi induzida a diarreia nos animais através da administração do óleo de rícino (10 mL/kg, v.o.) e após 1 hora, os animais foram tratados oralmente com salina, Th-EtOH_f (50 mg/kg v.o.), ou loperamida (5 mg/kg, v.o.). Passando-se uma hora, os animais receberam por via oral uma suspensão de carvão (0,2 mL/animal) contendo 10% de carvão ativado suspenso em 5% de goma arábica e após 20 min,

SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispidula* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.

os camundongos foram eutanasiados e o intestino delgado foi removido e estendido em uma superfície limpa. Em seguida, foi calculada a distância percorrida pelo carvão (marcador) em relação ao comprimento total do intestino delgado e essa distância foi expressa da seguinte forma:

$$\% \text{ da distância percorrida pelo marcador} = [A / B] \times 100$$

Onde:

A = representa a média da distância percorrida pelo carvão;

B = representa a média do comprimento total do intestino.

Na segunda etapa do experimento, foi examinado um possível envolvimento do sistema opióide no efeito do extrato na redução do trânsito gastrointestinal induzido por óleo de rícino. Então, foram utilizados outros grupos de animais, nos quais foi administrado, naloxona (2 mg/kg, s.c.), um antagonista opióide, e após 30 min, foram tratados, por via oral, com salina, Th-EtOH_f (50 mg/kg v.o.), ou loperamida (5 mg/kg, v.o.), sendo este último, um agonista opióide. Os próximos passos foram realizados como descrito na primeira parte do ensaio.

Na terceira etapa dos experimentos, seguiu-se o método descrito por Moraes (2012), utilizado o modelo de trânsito gastrointestinal estimulado por betanecol, um agonista colinérgico de receptores muscarínicos, para avaliar uma possível atividade anticolinérgica do Th-EtOH_f na redução do trânsito gastrointestinal em outro grupo de animais. Inicialmente, os animais foram pré-tratados oralmente com salina (2,5 mL/kg, v.o.), Th-EtOH_f (50 mg/kg v.o.), ou atropina (3 mg/kg, s.c.), um antagonista colinérgico, e após 30 min, os animais receberam betanecol (3 mg/kg, i.p.). Passando-se uma hora, os camundongos receberam por via oral uma suspensão de carvão (0,2 mL/animal) contendo 10% de carvão ativado suspenso em 5% de goma arábica e após 20 min, eles foram eutanasiados e foi mensurado a distância percorrida pelo carvão no intestino, a partir do piloro ao ceco, como foi descrito nas etapas anteriores.

Figura 6 – Representação esquemática do protocolo experimental de motilidade gástrica e modulação opióide

SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispida* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.

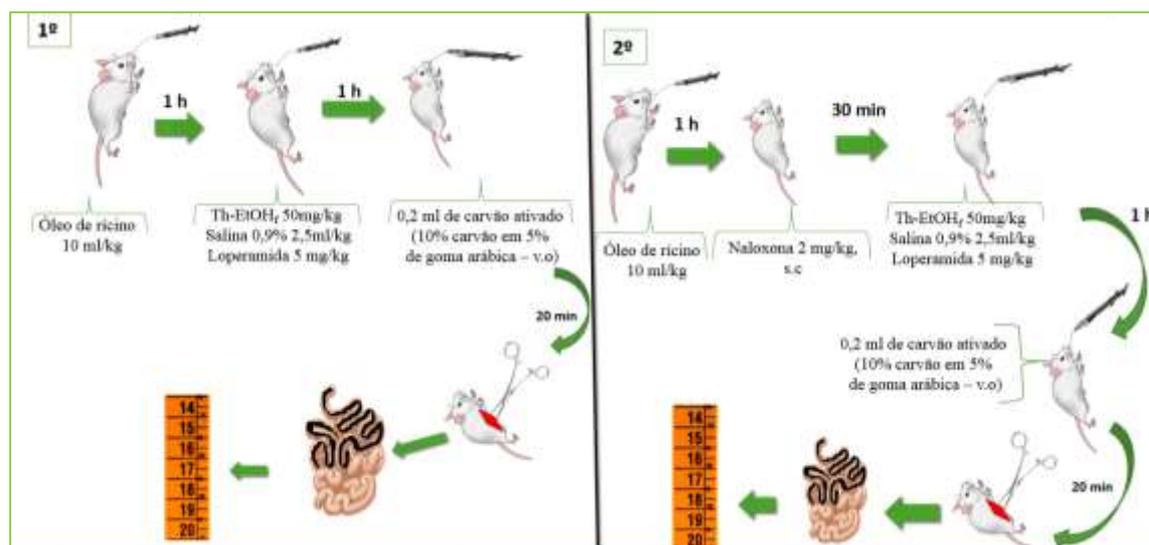
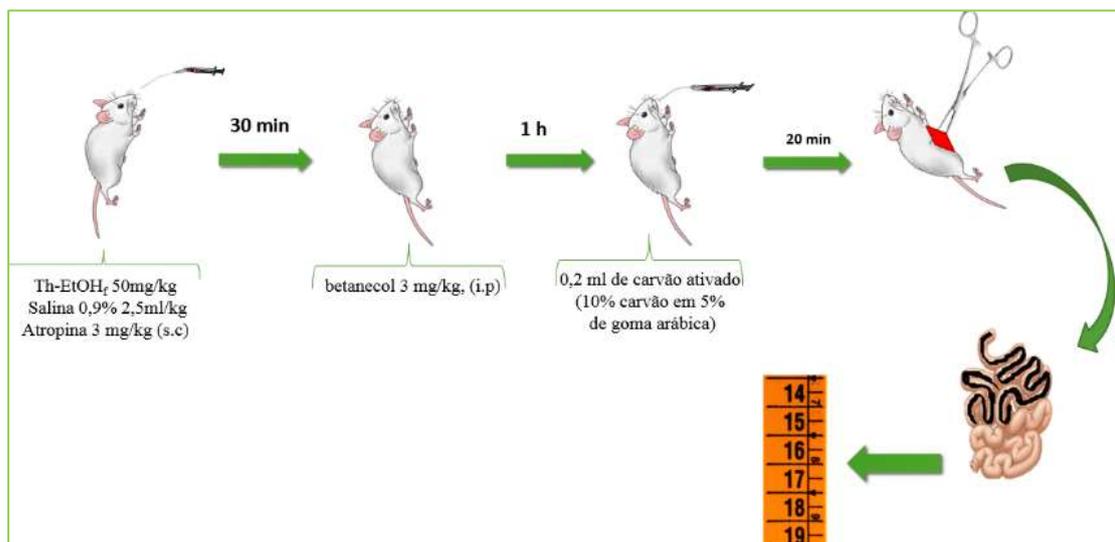


Figura 7 – Representação esquemática do protocolo experimental da modulação colinérgica



3.5.5 Avaliação efeito extrato etanólico Th-EtOH_f sobre o esvaziamento gástrico

O esvaziamento gástrico foi aferido através da técnica de Reynell e Spray (1978) modificada. Após jejum de 18 horas, os camundongos do grupo controle foram tratados por via oral com salina (2,5 mL/kg), enquanto o grupo teste foi tratado com o extrato etanólico Th-EtOH_f (50 mg/kg v.o.). Após 1 hora, os camundongos receberam, pôr gavagem, 300 µl de uma refeição teste que consistia de um marcador não absorvível (0,75 mg/mL de solução de vermelho de fenol em 5% de glicose). Decorridos 20 minutos, os animais foram eutanasiados e após a laparotomia, o estômago e o intestino delgado foram expostos, rapidamente isolados por ligaduras

SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispida* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.

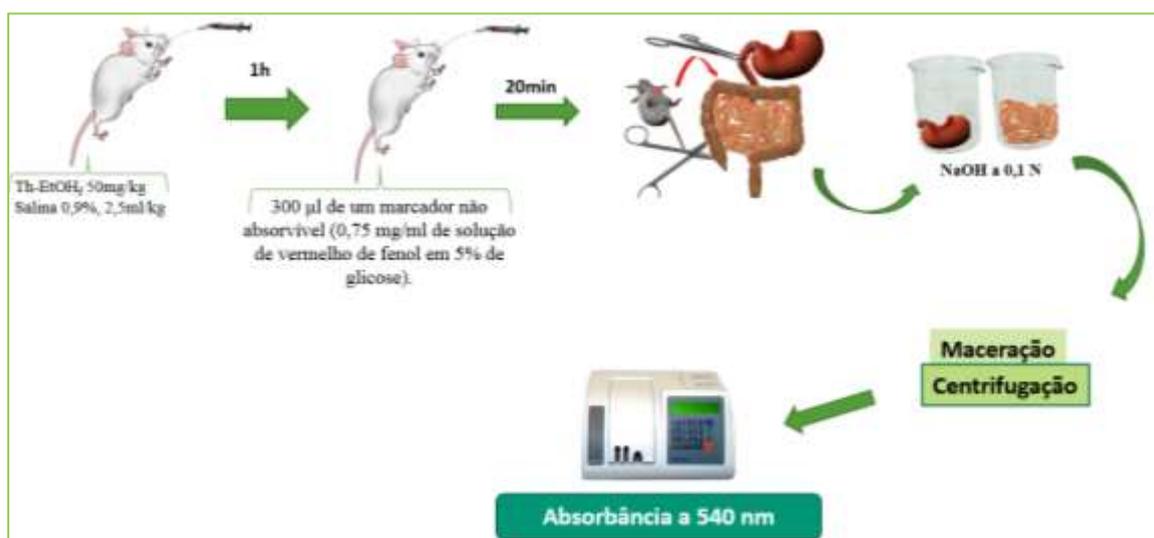
nas junções gastro-duodenal, esôfago-gástrica e íleo-cecal sendo finalmente removidos. Depois de sua retirada, o estômago e o intestino delgado foram colocados em uma mesa e divididos nos seguintes segmentos: estômago e intestino.

Cada um desses segmentos foi introduzido em um cilindro graduado e o volume total foi aferido através da adição de 10 mL de 0,1 N NaOH. A seguir, os segmentos foram homogeneizados por 30 s. Após 20 minutos da homogeneização, foi retirado 1 mL do sobrenadante e centrifugado por 10 minutos a 2800 rpm. As proteínas no homogeneizado foram precipitadas através da adição de ácido tricloroacético (20 %), e novamente centrifugadas por 20 min a 2800 rpm. A seguir, foram retirados 150 µl do sobrenadante e adicionados a 200 µl de 0,5 N de NaOH, juntamente com 600 µl de água destilada. A absorbância das amostras foi estabelecida em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 540 nm e expresso em densidade óptica (D.O.).

A curva padrão foi obtida por espectrofotômetro a 540 nm de uma concentração conhecida de vermelho de fenol diluída em 0,1 N NaOH. Após a determinação do coeficiente linear (α) da curva padrão, a concentração da solução ($C = D.O.$) e a quantidade de vermelho de fenol (m) por cada segmento ($m = C \times \text{volume}$) foram determinadas. A retenção gástrica (x) foi expressa em % de acordo com a seguinte fórmula:

(%) Retenção de corante no estômago $x = (\text{quantidade de vermelho de fenol no estômago} / \text{total de vermelho de fenol no estômago + intestino})$.

Figura 8 - Representação esquemática do protocolo experimental de esvaziamento gástrico



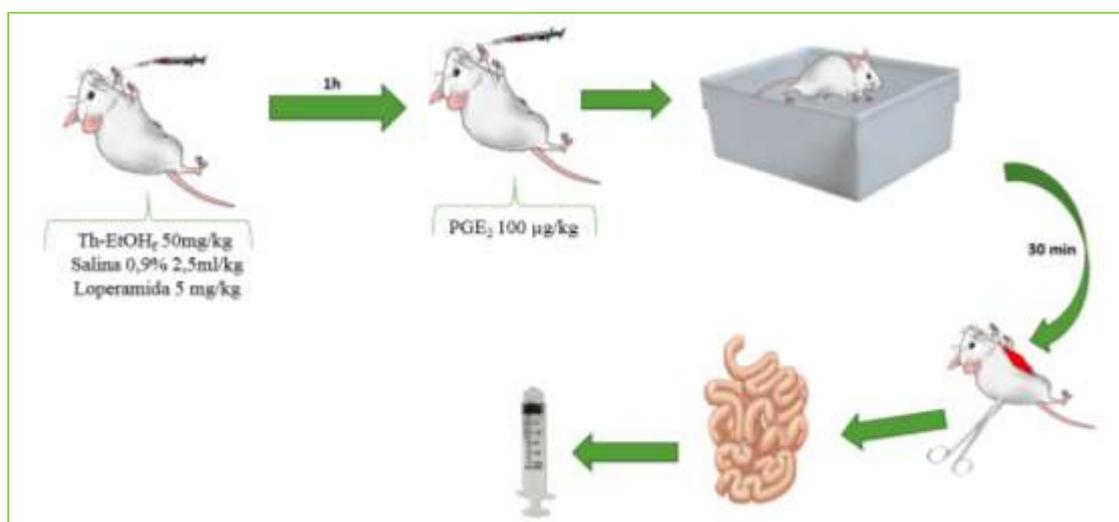
SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispidula* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.

3.5.6 Avaliação do efeito do extrato etanólico Th-EtOH_f no *enteropooling* induzido por PGE₂

Para a realização do presente ensaio foi utilizado o método descrito por Mukherjee et al. (1998), com algumas alterações. Primeiramente, os animais foram pré-tratados com salina (2,5 mL/kg, v.o.), extrato etanólico Th-EtOH_f (50 mg/kg v.o.) ou loperamida (5 mg/kg, v.o.). Imediatamente após os tratamentos, a diarreia foi induzida por PGE₂ (100 µg/kg, v.o.; Sigma Aldrich, EUA).

Após 30 min da administração de PGE₂, os animais foram eutanasiados e o intestino delgado a partir do piloro ao ceco foi retirado e seu conteúdo recolhido num tubo de ensaio graduado para aferir o volume do conteúdo intestinal. Para calcular a porcentagem de inibição da secreção de fluido intestinal foi utilizada a mesma fórmula descrita no protocolo de *enteropooling* com óleo de rícino.

Figura 9 – Representação esquemática do protocolo de *enteropooling* induzida por PGE₂



SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispidula* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.

3.6 Análise estatística

3.6.1 Análise estatística dos protocolos *in vivo*

Os dados estão apresentados como a média \pm EPM de animais em cada grupo (n = 6-7). Os resultados obtidos nos animais do grupo veículo tratados com solução salina foram utilizados como valores de referência. Em todos os casos, os resultados obtidos a partir dos grupos teste tratados com o fármaco de referência ou com o extrato foram comparados com os resultados obtidos a partir do controle tratado com solução salina. Os testes estatísticos foram realizados no software Graphpad Prism (versão 6.0). A significância estatística das diferenças entre grupos foi determinada por análise unidirecional da variância (ANOVA) e o teste de Tukey. Para estudar a fluidez das fezes, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn para comparações múltiplas. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispidula* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.

Resultados

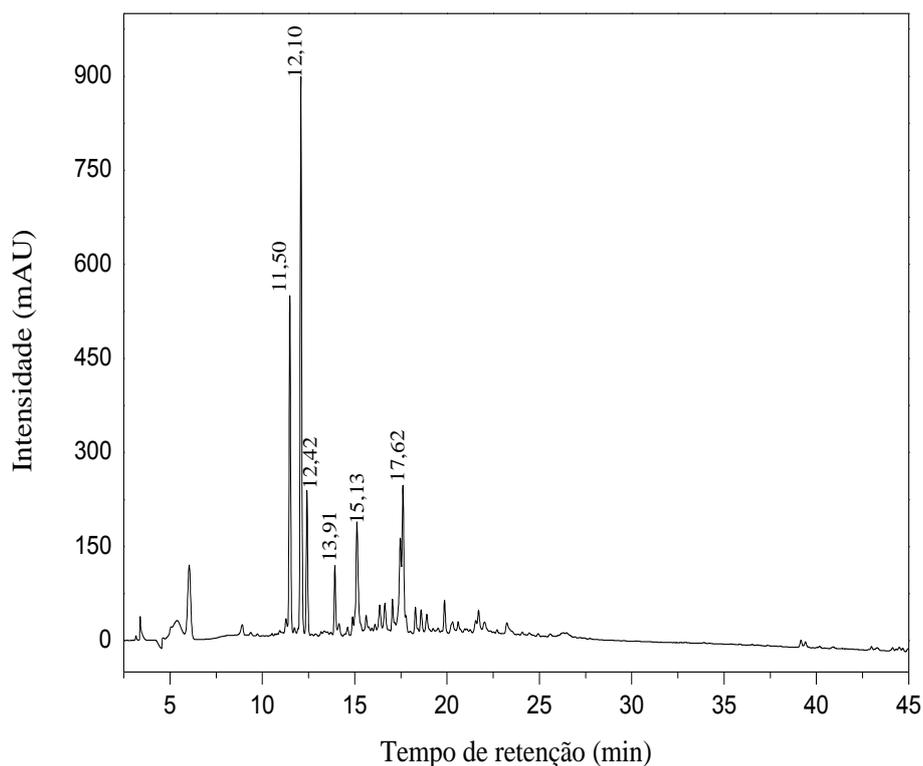
SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispidula* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.

4 RESULTADOS

4.1 Obtenção e análise do extrato etanólico Th-EtOH_f em HPLC analítico

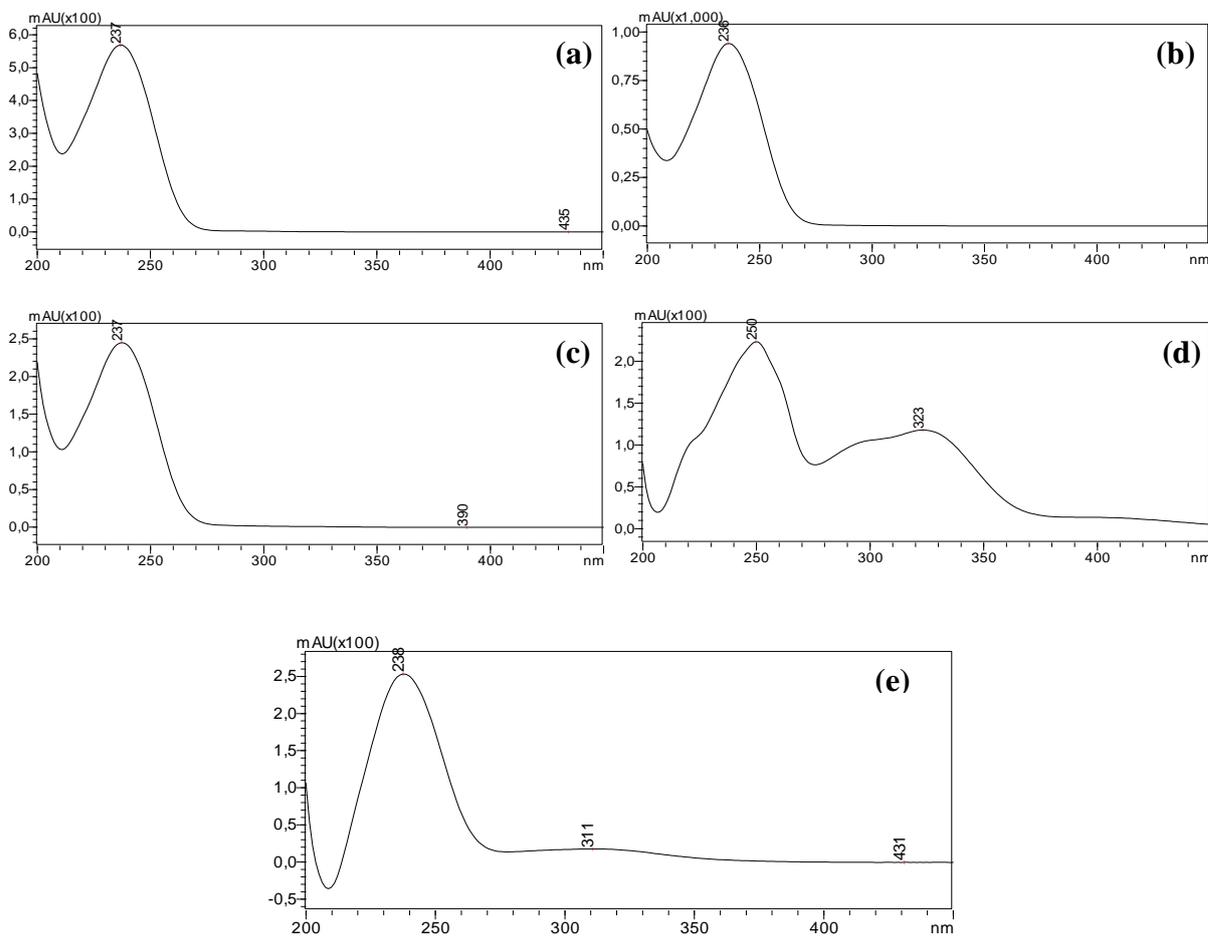
O perfil cromatográfico do o extrato etanólico Th-EtOH_f, obtido em HPLC analítico, mostrou bandas de maior absorção nos tempos de retenção (T_R) de 11,50; 12,10; 12,42 e 17,62 minutos (figura 10). Os espectros de UV destas bandas (figuras 11a, 11b, 11c, 11e) apresentaram uma absorção forte em aproximadamente 237-238 nm. Observa-se também que o espectro de UV da banda T_R de 15,13 minutos (figura 11d) mostra absorções em 250 e 323 nm.

Figura 10- Perfil cromatográfico em HPLC analítico do extrato etanólico Th-EtOH_f em 240 nm.



SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispidula* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.

Figura 11- Espectro de absorção UV para as bandas com TR de 11,50 (a), 12,10 (b), 12,42 (c), 15,13 (d) e 17,62 (e) minutos, no cromatograma do o extrato etanólico Th-EtOH_f.



SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispidula* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.

4.2 Resultados *in vivo*

4.2.1 Teste de toxicidade oral aguda

Durante o teste de toxicidade oral aguda, não houve mortes ou sinais de toxicidade com administração do extrato etanólico Th-EtOH_f na dose de 2000 mg/kg, via oral. Com relação ao peso dos animais durante os 14 dias de avaliação não houve alterações significativas entre o grupo controle (salina, v.o) e o grupo tratado com Th-EtOH_f (dados não apresentados), o peso dos órgãos retirados após a eutanásia também não mostrou alterações significativas (tabela 01), os níveis plasmáticos de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), uréia (UUV), albumina (ALB), bilirrubina direta (BID), bilirrubina total (BIT), creatinina (CRET), glicose (GLI), proteína total (PRO) e gama gt (GGT) não apresentaram diferenças significativas quando comparado ao grupo controle (tabela 02). Quando realizado a análise histológica desses órgãos, não apresentou alterações patológicas (figuras 12-16).

Tabela 1 - Efeito do extrato etanólico Th-EtOH_f (2.000 mg/kg, v.o.) sobre o peso absoluto (g) dos órgãos vitais de camundongos.

Órgãos	Th-EtOH _f	Controle
	M. Absoluto	M. Absoluto
Estômago	0,312 ± 0,016	0,304 ± 0,021
Baço	0,114 ± 0,004	0,112 ± 0,007
Fígado	1,356 ± 0,041	1,298 ± 0,025
Rins	0,438 ± 0,016	0,442 ± 0,018
Coração	0,174 ± 0,010	0,166 ± 0,013
Intestino	2,290 ± 0,088	2,162 ± 0,138
Pulmão	0,262 ± 0,032	0,312 ± 0,109

Legenda: Os valores estão expressos como média ± EPM. Teste t-Student.

SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispidula* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.

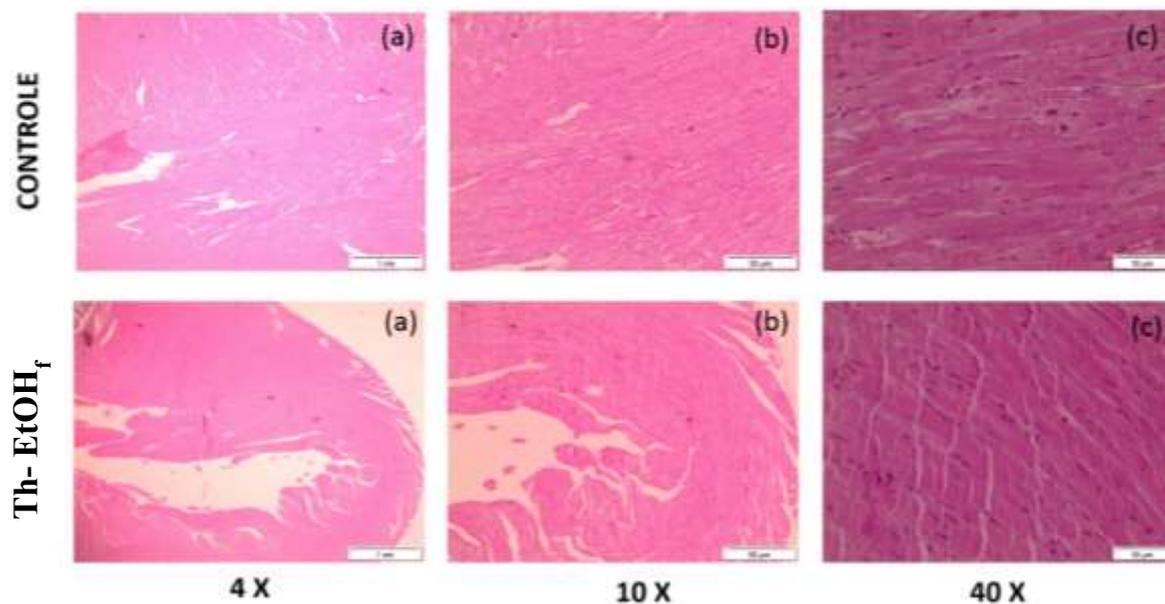
Tabela 2 - Efeito do extrato etanólico Th-EtOH_f (2.000 mg/kg, v.o.) nos parâmetros bioquímicos de camundongos

Parâmetros bioquímicos (unidade)	CONTROLE	Th- EtOH _f
ALB (g/dL)	2,074 ± 0,030	2,078 ± 0,068
ALT (U/L)	45,40 ± 3,415	51,20 ± 6,216
AST(U/L)	120,2 ± 12,46	133,0 ± 16,05
BID (mg/dL)	0,006 ± 0,002	0,006 ± 0,010
BIT (mg/dL)	0,074 ± 0,015	0,183 ± 0,062
CRET (mg/dL)	0,336 ± 0,046	0,272 ± 0,009
GLI (mg/dL)	145,6 ± 21,53	153,0 ± 19,56
PRO (mg/dL)	5,916 ± 0,219	6,050 ± 0,044
UUV (mg/dL)	47,60 ± 3,829	67,80 ± 13,98
GGT (mg/dL)	145,6 ± 21,53	153,0 ± 19,56

Legenda: Os valores estão expressos como média ± EPM. Teste t-Student. aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), uréia (UUV), albumina (ALB), bilirrubina direta (BID), bilirrubina total (BIT), creatinina (CRET), glicose (GLI), gama gt (GGT), proteína total (PRO).

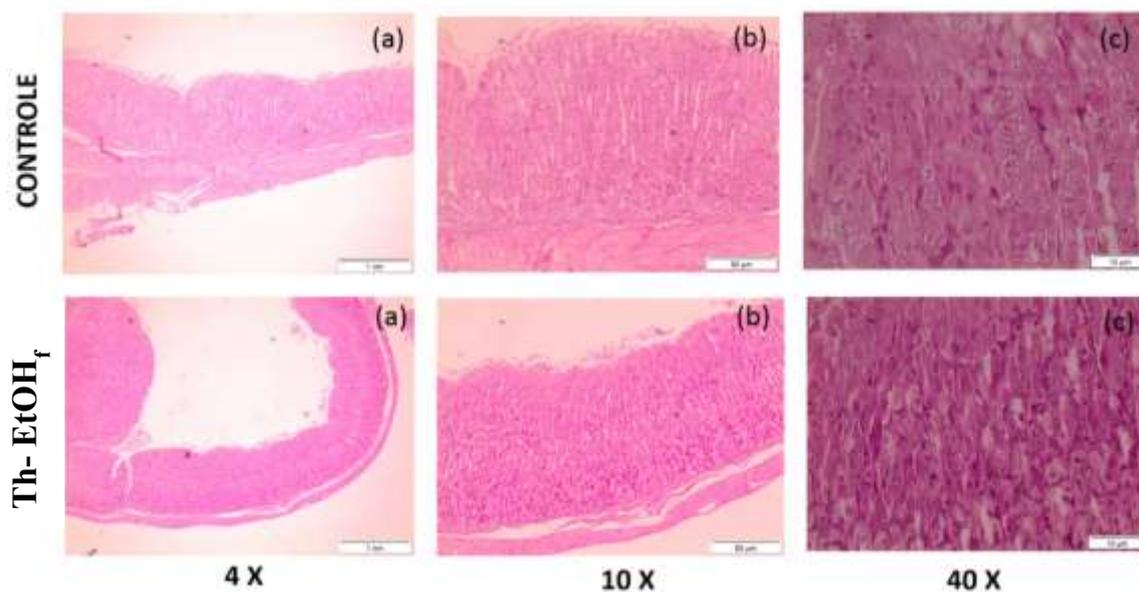
SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispidula* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.

Figura 12- Secções histológicas do coração após a administração do extrato etanólico Th-EtOH_f (2.000 mg/kg, v.o)



Legenda: Fotomicrografia do miocárdio, Grupo controle (salina, v.o) e Th-EtOH_f (extrato etanólico das folhas de *Tocoyena hispidula* Standl) objetiva de 4x (a), 10x (b), 40x (c).

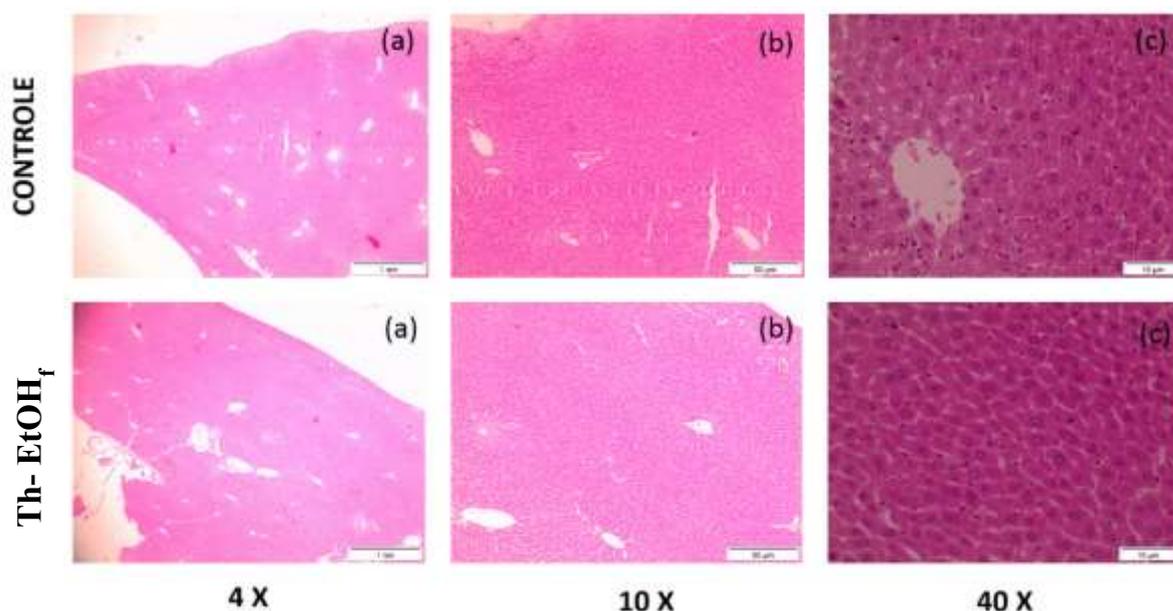
Figura 13- Secções histológicas do estômago após a administração do extrato etanólico Th-EtOH_f (2.000 mg/kg, v.o)



Legenda: Fotomicrografia do estômago, Grupo controle (salina, v.o) e Th-EtOH_f (extrato etanólico das folhas de *Tocoyena hispidula* Standl) objetiva de 4x (a), 10x (b), 40x (c).

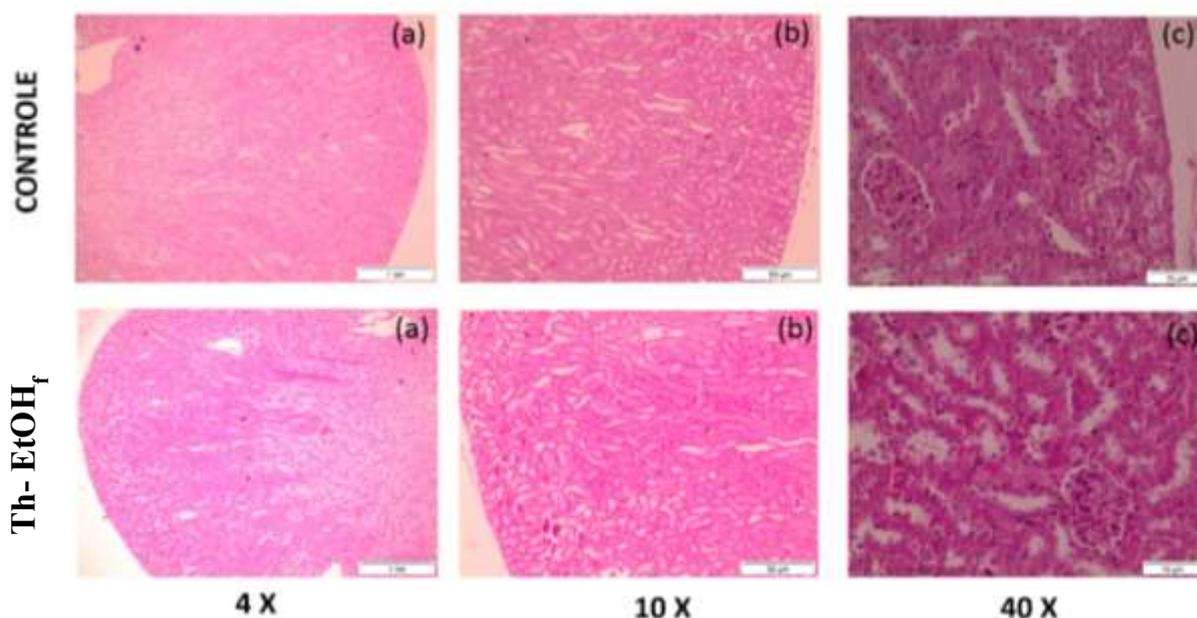
SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispidula* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.

Figura 14- Secções histológicas do fígado após a administração do extrato etanólico o extrato etanólico Th-EtOH_f (2.000 mg/kg, v.o)



Legenda: Fotomicrografia do fígado, Grupo controle (salina, v.o) e Th-EtOH_f (extrato etanólico das folhas de *Tocoyena hispidula* Standl) objetiva de 4x (a), 10x (b), 40x (c).

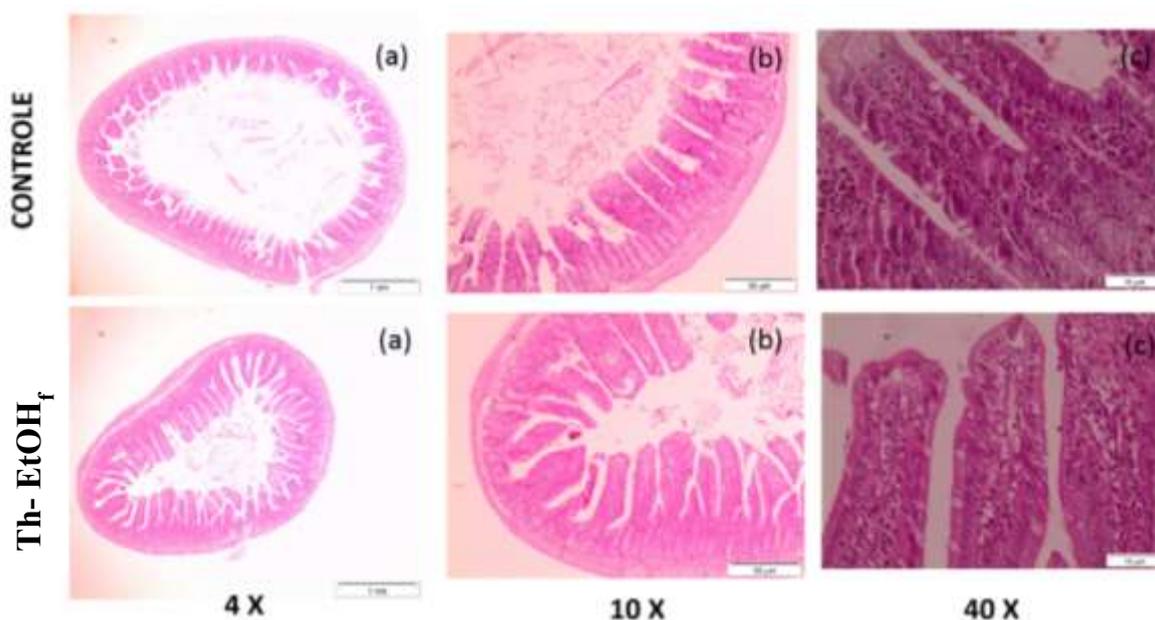
Figura 15- Secções histológicas do rim após a administração do extrato etanólico Th-EtOH_f (2.000 mg/kg, v.o)



Legenda: Fotomicrografia do rim, Grupo controle (salina, v.o) e Th-EtOH_f (extrato etanólico das folhas de *Tocoyena hispidula* Standl) objetiva de 4x (a), 10x (b), 40x (c).

SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispidula* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.

Figura 16- Secções histológicas do intestino após a administração do extrato etanólico Th-EtOH_f (2.000 mg/kg, v.o)

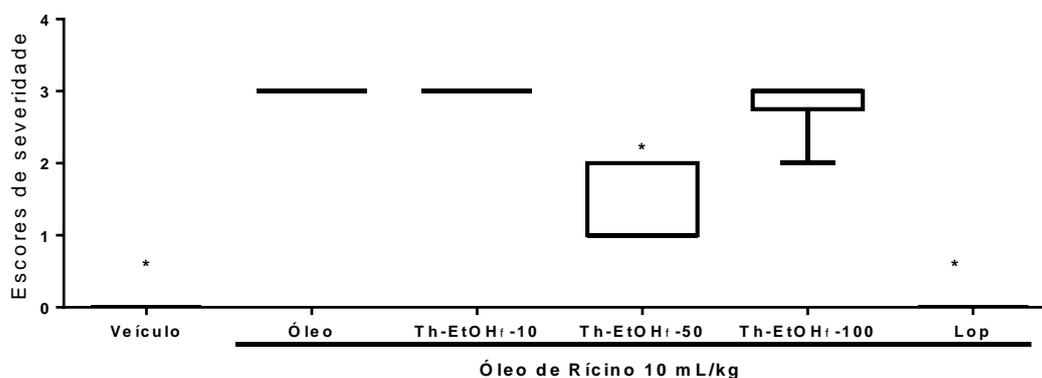


Legenda: Fotomicrografia do intestino, Grupo controle (salina, v.o) e Th-EtOH_f (extrato etanólico das folhas de *Tocoyena hispidula* Standl) objetiva de 4x (a), 10x (b), 40x (c).

4.2.2 Escores de severidade e efeito do extrato etanólico Th-EtOH_f sobre a redução da diarreia induzida por óleo de rícino

As doses administradas do extrato etanólico Th-EtOH_f (10; 50; 100 mg/kg) diminuíram significativamente os escores de severidade diarreica (figura 17).

Figura 17- Redução dos escores de severidade diarreica pelo extrato etanólico Th-EtOH_f em modelo diarreia induzida por óleo de rícino em camundongos



SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispidula* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.

Legenda: Os valores estão expressos como mediana \pm EPM (n = 5-7). *p <0,05 quando comparado com o grupo veículo + óleo de rícino. Os dados apresentados são medianas com pontuação mínima e máxima. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn foi usado para as comparações múltiplas. Abreviaturas: Lop, loperamida; Th-EtOH_f, *Tocoyena hispidula*.

4.2.3 Efeito do extrato etanólico Th-EtOH_f sobre a diarreia induzida por óleo de rícino

Nos experimentos realizados, observa-se que em todas as doses testadas (10; 50; 100 mg/kg), a *Tocoyena hispidula* foi eficaz em reduzir a massa total de fezes (1,87 \pm 0,29* g/ 38,07%; 1,50 \pm 0,09 g/ 50,33%; 1,42 \pm 0,19 g/ 52,98%; 1,78 \pm 0,26 g/ 37,41% respectivamente) e a massa total de fezes diarreicas no prazo de 3 horas após a administração do óleo de rícino, em comparação com o grupo controle (0,25 \pm 0,03g). Este experimento demonstrou que o extrato também reduziu a diarreia de modo geral (30,52%; 46,98%; 46,18%, 41,05% respectivamente) quando comparado com o controle. É válido ressaltar que a dose que apresentou maior eficácia na redução do total de fezes e de fezes diarreicas foi a dose de 100 mg/ kg (Tabela 3).

Tabela 3 - Efeito do extrato etanólico Th-EtOH_f na diarreia induzida por óleo de rícino em camundongos.

Tratamento (v.o.)	Peso total de fezes (g)	Inibição da defecação (%)	Peso total de fezes diarreicas (g)	Inibição da diarreia (%)
Salina (2,5 mL/kg)	0,25 \pm 0,03	-	0,09 \pm 0,01	-
Óleo de Rícino (10 mL/kg)	3,02 \pm 0,30	-	2,49 \pm 0,12	-
Th-EtOH _f (10 mg/kg)	1,87 \pm 0,29*	38,07	1,73 \pm 0,28	30,52
Th-EtOH _f (50 mg/kg)	1,50 \pm 0,09*	50,33	1,32 \pm 0,20*	46,98
Th-EtOH _f (100 mg/kg)	1,42 \pm 0,19*	52,98	1,34 \pm 0,14*	46,18
Loperamida (5 mg/Kg)	0,19 \pm 0,04*	93,70	0,09 \pm 0,02*	96,38

Legenda: Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. (n = 5-6). *p <0,05 quando comparado com o grupo controle.

4.2.4 Redução da geração de fluido intestinal pelo extrato etanólico Th-EtOH_f na diarreia induzida por óleo de rícino

Para avaliar a geração de fluidos durante o processo diarreico, foi utilizado o teste de *enteropooling* como forma avaliativa para este parâmetro. As doses de Th-

SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispida* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.

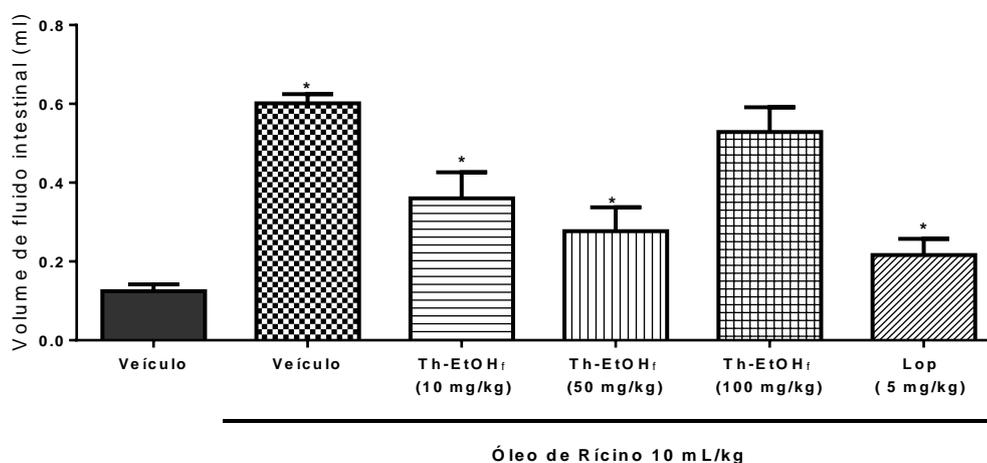
EtOH_f (10; 50; 100 mg/kg) reduziram significativamente o volume de fezes intestinais (40%; 55%, 13,33% respectivamente) quando comparado com o controle (tabela 4). Com os resultados de inibição de diarreia e *enteropooling*, sendo que ao levar em consideração todos estes resultados preliminares, pode-se observar que a dose de 50 mg/kg obteve os melhores resultados frente as outras doses, e portanto, utilizou-se esta como a dose padrão para os testes seguintes.

Tabela 4- Efeito do extrato etanólico Th-EtOH_f sobre o *enteropooling* induzido por óleo de rícino em camundongos.

Tratamento (v.o.)	Peso total do conteúdo intestinal (g)	Volume do conteúdo intestinal (ml)	Inibição (%)
Veículo (2,5 mL/kg)	1,76 ± 0,04	0,10 ± 0,01	-
Veículo + óleo de rícino (10 mL/kg)	2,37 ± 0,05	0,60 ± 0,02	-
Th-EtOH _f (10 mg/kg)	2,25 ± 0,06	0,36 ± 0,04*	40,00
Th-EtOH _f (50 mg/kg)	1,99 ± 0,04	0,27 ± 0,02*	55,00
Th-EtOH _f (100 mg/kg)	1,65 ± 0,04	0,52 ± 0,01	13,33
Loperamida (5 mg/Kg)	1,55 ± 0,10	0,21 ± 0,01*	70,64

Legenda: Os valores estão expressos como média ±EPM (n = 5-7). * p <0,05 quando comparado com o grupo controle.

Figura 18- Efeito do extrato etanólico Th-EtOH_f sobre o *enteropooling* induzido por óleo de rícino em camundongos.



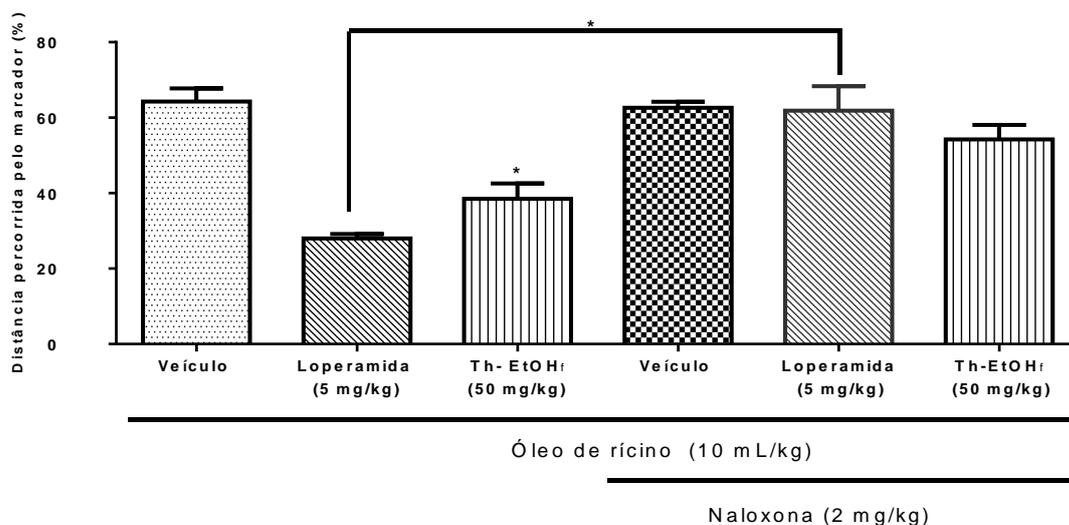
Legenda: Lop, loperamida. Os valores estão expressos como média ±EPM (n= 5-7). *p<0,05 quando comparado com o grupo veículo + óleo de rícino.

SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispida* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.

4.2.5 Efeito do extrato etanólico Th-EtOH_f mediado pelo sistema opióide

Para avaliar o trânsito gastrointestinal, a distância percorrida pelo carvão foi mensurada. Na análise inicial, pode-se observar que a distância percorrida pelo marcador no grupo de animais tratados com extrato etanólico Th-EtOH_f ficou em torno de $38,49 \pm 4,07\%$ do comprimento total do intestino, valor este significativamente menor ($p < 0,05$; figura 19) do que o observado no grupo que recebeu salina e óleo de rícino ($64,27 \pm 3,500$). Na análise seguinte, pode-se observar que o grupo que recebeu naloxona e Th-EtOH_f ao ter a motilidade estimulada com óleo de rícino apresentou a distância média percorrida pelo marcador de $54,24 \pm 3,81\%$ e não apresentou diferença estatística quando comparado com o grupo que foi pré-tratado com da primeira análise.

Figura 19 - Atividade do extrato Th-EtOH_f no trânsito intestinal induzido por óleo de rícino em camundongos e modulação do sistema opióide



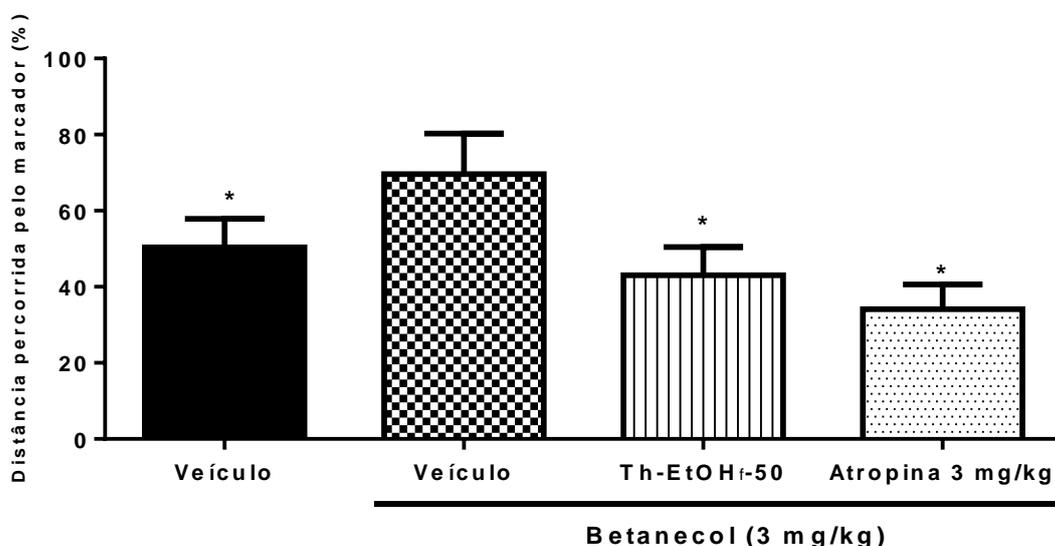
Legenda: Todos os animais receberam óleo de rícino para a produção de diarreia. No grupo de animais tratados com o extrato etanólico Th-EtOH_f (50 mg/ kg) houve diminuição significativa ($*p < 0,05$) do trânsito intestinal, a partir da distância marcada pelo carvão através do intestino delgado e o pré-tratamento do grupo do extrato etanólico Th-EtOH_f com naloxona (2 mg/kg, sc) não alterou o trânsito. Os resultados foram expressos como média \pm EPM de um mínimo de 5 animais por grupo. $*p < 0,05$ vs. grupo Veículo+óleo de rícino; quando compara-se os grupos Lop+óleo de rícino e Lop+Naloxona+óleo de rícino. Análise estatística: ANOVA seguido do teste de Tukey.

SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispidula* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.

4.2.6 Avaliação da participação da via muscarínica no efeito promovido pelo extrato etanólico Th-EtOH_f sobre o trânsito gastrointestinal de camundongos

Nos resultados abaixo, pode-se notar que o carvão percorreu uma distância média de 50,34% do intestino delgado no grupo salina. O grupo de animais que foram tratados apenas com solução salina e betanecol (3mg/kg) obtiveram média de 69,58% do percurso intestinal, valor este significativo, quando comparado com os animais usados como grupo veículo. Os grupos de animais que foram tratados com o extrato etanólico Th-EtOH_f (50 mg/kg) e atropina (3 mg/kg) apresentaram valores médios de distância percorrida pelo carvão no intestino delgado de 43,07 % e 34,14 %, respectivamente, que são significativamente menores ($p < 0,05$) do que o grupo que recebeu o betanecol (figura 20).

Figura 20 - Efeito do extrato etanólico Th-EtOH_f sobre o trânsito intestinal estimulado por betanecol em camundongos



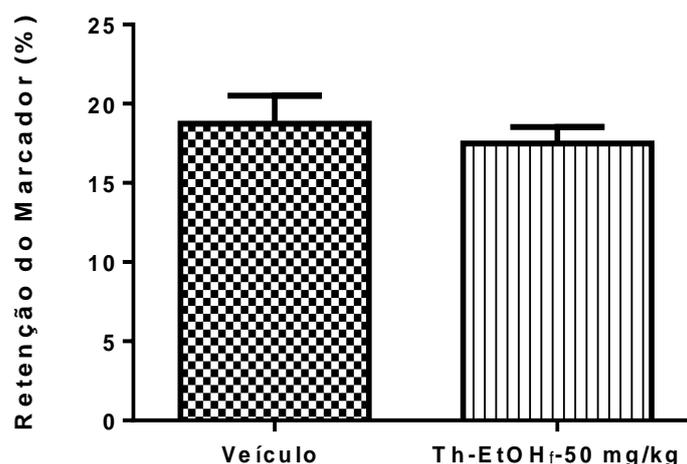
Legenda: Os animais receberam betanecol (3 mg/kg) para induzir um aumento da motilidade intestinal e o pré-tratamento com o extrato etanólico Th-EtOH_f (50 mg/kg) ou atropina (3 mg/kg) foram capazes de reduzir significativamente a ação muscarínica sobre o trânsito intestinal. Os resultados foram expressos como média \pm EPM de um mínimo de 5 animais por grupo. * $p < 0,05$ quando se compara o grupo veículo+betanecol vs. veículo, *Tocoyena hispidula* + betanecol, atropina + betanecol. ANOVA seguido do teste de Tukey.

SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispidula* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.

4.2.7 Efeito do extrato etanólico Th-EtOH_f sobre o esvaziamento gástrico de camundongos

Nas análises realizadas foi possível notar que o extrato etanólico Th-EtOH_f não altera o perfil de esvaziamento gástrico nos animais, pois o grupo controle teve uma taxa de retenção do marcador de $18,74 \pm 1,75$ % e o grupo que recebeu o extrato de *Tocoyena hispidula* teve uma taxa de retenção do marcador de $17,49 \pm 1,03$ % o que mostra que não há diferença estatística quando comparamos ambos os valores (figura 21).

Figura 21- Esvaziamento gástrico de camundongos tratados e não tratados com o extrato etanólico Th-EtOH_f



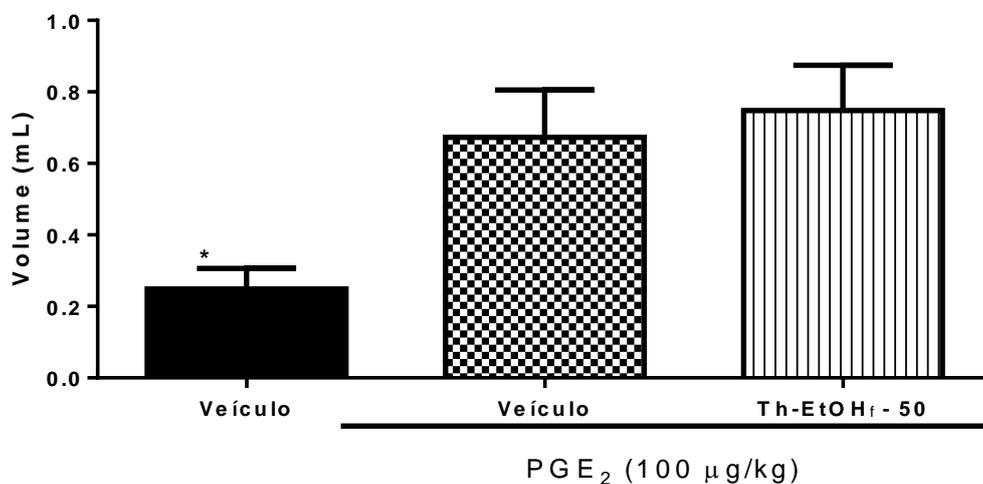
Legenda: Observe que não há diferença estatística nos dois grupos, mostrando que o extrato etanólico Th-EtOH_f não altera o perfil de esvaziamento gástrico nesses animais. Foram utilizados grupos de 6-7 animais e a análise estatística foi feita utilizando o teste t de Student. Obs.: O marcador utilizado foi o vermelho de fenol, que se torna rosáceo (magenta) em pH > 8,2.

4.2.8 Efeito do extrato etanólico Th-EtOH_f sobre os parâmetros de diarreia causados por PGE₂

A partir dos resultados, observou-se que o tratamento com o extrato etanólico de *Tocoyena hispidula* Standl não reduziu o fluido intestinal em $0,7480 \pm 0,05678$ dos camundongos com *enteropooling* induzido por PGE₂ (Figura 22), pois a *Tocoyena hispidula* Standl não foi capaz de reduzir a geração de fluidos intestinais causado pela ação da PGE₂ no intestino de forma diferente a loperamida (fármaco antidiarreico padrão) que reduziu significativamente a produção de fluidos em $0,4720 \pm 0,2634$.

SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispidula* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.

Figura 22 - Efeito do Extrato etanólico de *Tocoyena hispidula* Standl sobre o enteropooling induzido por PGE₂ em camundongos



Legenda: Os valores estão expressos como média ± EPM (n = 5-7). *p<0,05 quando comparado com o grupo controle.

SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispidula* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.

Discussão

SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispidula* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, avaliou-se a atividade antidiarreica de um extrato de *Tocoyena hispidula* em modelos experimentais de diarreia, uma desordem gastrointestinal onde há a passagem de fezes com o aumento na secreção de água e eletrólitos que relaciona-se com a motilidade intestinal (AUTH; VORA; KOKAI, 2016; THIAGARAJAH et al., 2018).

As plantas medicinais tem sido uma alternativa utilizada pela população para o alívio e tratamento desta patologia desde os tempos primitivos, diversos estudos já foram realizados em busca de elucidar os mecanismos pelos quais os compostos oriundos de plantas estariam atuando nesta desordem gastrointestinal como os realizados com a *Punica granatum* Linn no qual avaliou-se os efeitos dessa planta sobre os distúrbios intestinais, resultados semelhante foram encontrados por Fonseca (2017) que verificou a atividade espasmolítica e antidiarreica da *Platonia insignis* Mart. “bacuri” aos quais salientaram que os compostos bioativos oriundos de plantas podem ser uma alternativa viável para o tratamento de patologias intestinais (QNAIS et al., 2007; TASNEEM et al., 2019; SANTOS et al., 2019).

A parte da planta a ser utilizada varia de acordo com a necessidade, as folhas tendem a ser as mais procuradas devido a facilidade de sua coleta quando comparado as outras partes, tornando-as mais utilizada como componente de remédios. No meio científico sabe-se que as folhas produzem mais metabólicos secundários ativamente que outras partes de plantas (BAYDOUN et al., 2015; BAHADUR et al., 2018).

Os extratos de plantas dispõem de inúmeras vantagens para descoberta de novos constituintes, visto que oferecem uma mistura de constituintes fitoquímicos, o sinergismo desses são, em maioria, os responsáveis por sua maior ação farmacológica quando comparado ao isolamento de um único, explica-se que o isolamento do constituinte é favorável quando a sua a maior atividade está em um único constituinte (PARANJPE et al., 2013).

O método a ser utilizado para extração depende do objetivo, pesquisas indicam que o hexano é o solvente mais utilizado, porém o seu uso tem sido desacreditado devido a sua toxicidade, o etanol possui alguns benefícios citados na literatura dentre eles o fato de ser atóxico, causar menos malefícios ao meio ambiente e ser classificado pela FDA (*Food and Drug Administration*) como de classe 3, por possuir riscos mínimos a saúde humana e ser considerado uma substancia menos toxica,

SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispidula* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.

(NETO; BATISTA; MEIRELLES., 2018). Visto que estudos anteriores não foram realizados com o extrato etanólico das folhas de *Tocoyena hispidula* Standl e que nossos estudos preliminares demonstraram um bom potencial farmacológico decidimos por utilizá-lo na investigação da atividade antidiarreica. Buscando correlacionar os constituintes químicos e a possível ação farmacológica do extrato etanólico das folhas de *Tocoyena hispidula* Standl optamos por utilizar análise cromatográfica.

Inicialmente, foi verificado o perfil cromatográfico do extrato etanólico Th-EtOH_f (Figura 1), usando o HPLC analítico, os resultados mostraram bandas de maior absorção nos tempos de retenção (T_R) de 11,50; 12,10; 12,42 e 17,62 minutos. Os espectros de UV destas bandas (Figuras 2a, 2b, 2c e 2e) apresentaram uma absorção mais proeminente em aproximadamente 238 nm, característica de compostos da classe dos iridoides (LI et al., 2008).

Os iridoides são metabólicos secundários que podem ser divididos em carbocíclicos e seco-iridoides, sendo mais presente na forma glicosilada (CARRERAS; MIGUEL; ALEIXANDRE., 2012; SILVA et al., 2018), são muito encontrados e estudados em várias famílias de plantas medicinais em especial a Rubeaceae dentre elas *Tocoyena formosa* (Cham & Schltidl) K.Schum (BARROS et al., 1996) *Galium verum subsp. verum* (DEMIREZER et al., 2005) *Gardenia jasminoides* Ellis (FU et al., 2014), *Genipa americana* e *Anthocephalus chinensis* Miq. *Hedyotis tenelliflora* Blume (MARTINS; NUNEZ., 2015), *Morinda morindoides* Milne-Redh (SERI et al., 2017), com diversas ações farmacológicas já descritas na literatura como ação antifúngica, antiviral, anti-inflamatória, antinociceptiva, antioxidante, antibacteriana entre outros (BARROS et al., 1996; GHISALBERTI, 1998; DINDA; DEBANATH; BANIK., 2011; YANG et al., 2019), como também ações no trato gastrointestinal apresentando atividade antidiarreica (JAISWAL et al., 2010), amebicida (CARRERAS; MIGUEL; ALEIXANDRE., 2012) e possuem ação sobre a função hepática melhorando-a e apresentando também a capacidade de estimular a eliminação de ácidos biliares (CHANG et al., 1983; MIYAGOSHI; AMAGAVA; OGIHARA., 1988). Desta forma, pode-se sugerir que os iridoides são os compostos majoritários no extrato etanólico Th-EtOH_f.

Quando analisados o espectro de UV da banda com T_R de 15,13 minutos (Figura 2d) este mostrou absorções em 250 e 323 nm sugerindo tratar-se de composto

SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispidula* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.

da classe dos flavonoides (LI; SCHMITZ, 2015). Os flavonoides tratam-se constituintes polifenólicos com peso molecular baixo, responsáveis por diversas atividades farmacológicas já conhecidas como por exemplo atividade antibacteriana, antioxidante, cardioprotetora dentre outras sabe-se que estes compostos são produzidos em sua maioria em pequenas quantidades e que sua produção bem como o acúmulo estão diretamente relacionadas com agentes causadores de estresse, atuando como defensor, e também ao processo de climatização ao meio ambiente, auxiliando no processo de defesa dessas espécies (DE OLIVEIRA et al., 2019; NAGULA; WAIRKAR., 2019; RENGASAMY et al., 2019)

Para a fração hexânica proveniente da partição líquido-líquido do extrato EtOH das folhas são descritos na literatura a presença do D-manitol, α -tocoferol, (*E*)- fitol, dos esteroides sitosterol e estigmasterol, dos triterpenos ácidos ursólico, oleanólico e rotungênico, bem como de uma mistura de triacilgliceróis de ácidos graxos saturados e insaturados (SANTIAGO; CHAVES, 2018).

Com o crescente uso das plantas medicinais, os estudos toxicológicos tornam-se imprescindíveis, visto que uso destas herbárias também pode oferecer efeitos adversos, todavia, a investigação toxicológica pré-clínica e clínica são necessárias para que seja garantida a segurança, bem como eficácia dos mesmos conforme a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2014).

A ANVISA fornece um “Guia para Condução de Estudos não Clínicos de Toxicologia e Segurança Farmacológica Necessária ao Desenvolvimento de Medicamentos”, de acordo com este guia, estudos iniciais de Toxicidade Aguda devem ser realizados, um dos métodos citados para esta avaliação é o Teste de Toxicidade Aguda de Classe de número 423/2001, preconizado pela Organização para a Cooperação de Desenvolvimento Econômico (OECD), que faz o uso de uma menor quantidade de animal quando comparado ao método de DL₅₀ (dose letal para 50% dos animais) (ANVISA, 2014; LEÓDIDO, 2017; EPA, 2017). Visto a necessidade de investigação toxicológica, realizamos a metodologia de investigação de Toxicidade Aguda de Classe conforme a OECD *Guideline* 423 (2001) utilizando de uma única dose de 2.000 mg/kg em um período de 24 horas.

Ao realizar-se o estudo toxicológico, não foi possível calcular a DL₅₀ visto que ao administrar uma única dose do extrato etanólico Th-EtOH_r (2.000 mg/kg) não houve mortes durante o período de monitoramento (14 dias), além disso os animais não

SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispidula* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.

apresentaram alterações comportamentais, estes permaneceram com o peso corporal sem modificações, e também não apresentaram inconformidades com relação ao peso dos órgãos (intestino, estômago, rim, coração, fígado), conforme a OECD e substâncias com a DL_{50} entre 2000 – 5000 mg/kg são consideradas de classe 5, o que supõe que sejam seguras, contudo para a melhor elucidação faz-se necessária a realização de estudos histológicos e bioquímicos.

A funcionalidade de alguns órgãos pode ser analisada por concentrações bioquímicas séricas, que em uma avaliação toxicológica são valiosas para identificação de sinais de toxicidade, enzimas hepáticas como alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) mostram a totalidade celular, estas são originadas majoritariamente pelo fígado que ao sofrer um dano começa a produzi-las em maior escala, sendo este um sinal de toxicidade, já os níveis de proteína total bem como albumina, bilirrubina e gama GT determinam a funcionalidade do fígado, a diminuição dos níveis séricos destes marcadores sugerem que a função hepática está reduzida, um achado comum em casos de danos no fígado ou patologias, já o aumento destes níveis geralmente estão atrelados a ingestão de proteínas em uma dieta ou a condições cancerosas (BARIWENI et al., 2018).

A monitorização da funcionalidade dos rins também é crucial quando se trata de uma triagem toxicológica, mais comumente é avaliado pelos níveis de ureia e creatinina, o aumento nos níveis de ureia é sugestivo de má funcionalidade renal ou que o animal apresenta desidratação, contudo níveis diminuídos são correlacionados a insuficiência hepática aguda, já a creatinina se trata de um indicador de filtração glomerular (UGWAH-OGUEJIOFOR et al., 2019).

Os níveis de glicose em um animal podem sofrer influência de muitos fatores, dentre eles o período de jejum, neste caso os níveis de glicose são diminuídos drasticamente, se a glicose mantiver seus níveis elevados mesmo com o animal em jejum pode ser sugestivo de diabetes, necessitando de maiores investigações (ROBERTO et al., 2018).

Ao realiza-se a análise dos parâmetros bioquímicos dos camundongos, verificou-se que não houve alteração nos níveis plasmáticos de aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, bilirrubina total, bilirrubina direta, albumina, proteína total, gama GT, creatinina, uréia e glicose não apresentaram diferenças significativas, quando comparados ao grupo controle, que corroboram

SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispidula* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.

também com os parâmetros histológicos que permaneceram inalterados. De acordo com o teste toxicológico, foi possível constatar que o extrato não apresenta sinais de toxicidade aguda, sendo assim, possível prosseguir com a investigação farmacológica.

Este estudo evidenciou que o extrato etanólico Th-EtOH_r possui atividade antidiarreica em roedores constatados em vários protocolos de diarreia aguda e evidenciados em protocolos de diarreia induzidos por óleo de rícino estes resultados corroboram com outros estudos realizados para comprovar a atividade antidiarreica de plantas medicinais utilizadas pela população como *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Sales et al., 2015) *Bide biternata* (Lour.) Merr. (KINUTHIA; MURIITHI; MWANGI, 2016), *Clitorea ternatea* Linn (PANDHARE et al., 2018).

Inicialmente, os testes realizados foram direcionados para a avaliação da diarreia aguda induzida por óleo de rícino. Quando administrado, o óleo de rícino é hidrolisado em glicerol e ácido rinoleico pelas lipases do pâncreas, sendo o ácido rinoleico o responsável pela atividade diarreica, através do aumento do peristaltismo e modificações na osmolaridade celular do intestino delgado, diminuindo em concomitância a permeabilização de Na⁺ e Cl⁻, acarretando também o acúmulo de substâncias no lúmen do intestino. O ácido rinoleico causa irritação da mucosa intestinal, bem como ação inflamatória, liberando prostaglandinas, no intestino delgado, provoca vasodilatação, contratibilidade do músculo liso, bem como secreção de muco no intestino delgado, pela ação das prostaglandinas e fator ativador de plaquetas, óxido nítrico e ativação da adenilciclase, resultado na produção de AMPc, elevando desta forma o peristaltismo intestinal (MASCOLO et al., 1993; YOSHIO et al., 1999; SINGH; KUMAR, 2017; ROJAS-BEDOLLA et al., 2018).

Nos resultados obtidos com todas as doses de *Tocoyena hispidula* Standl foi possível observar a redução significativa da quantidade total de fezes, bem como de fezes diarreicas, inibindo a defecação e a diarreia induzida por óleo de rícino, o que sugere que o extrato etanólico e a fração hexânica das folhas de *Tocoyena hispidula* Standl (10; 50; 100 mg/kg) é capaz de inibir fatores envolvidos na elevação da motilidade gastrointestinal e modificações na permeabilidade da membrana, resultados semelhantes foram encontrados em um mesmo modelo de diarreia induzida por óleo de rícino realizados por Bello et al. (2016) que analisou o efeito do extrato metanólico de *Nymphaea lottus* Linn. constatando que o extrato foi capaz de inibir a diarreia

SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispidula* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.

induzida por óleo de mamona de maneira dose-dependente.

Um estudo também realizado com o mesmo protocolo anterior observou-se o efeito do extrato etanólico da *Paederia foetida* Linn (Rubeaceae), onde o extrato aumentou o tempo de latência diarreica induzida por óleo de rícino, quando administrado nas doses de 100 e 500 mg/kg, com diminuição do número de fezes nas primeiras horas do estudo (AFROZ et al., 2006), os mesmos achados foram encontrados por Pandhare et al., (2018) que ao analisar o efeito antidiarreico do extrato etanólico das folhas de *Clitoria ternatea* Linn. verificou que este foi capaz de diminuir o tempo de evacuações bem como número de fezes húmidas.

Os resultados dos escores de severidade deram significativos na dose de 50 mg/kg do extrato, que indica que houve uma menor severidade na sujidade perianal dos animais, quando comparado ao grupo que recebeu apenas o controle (óleo + veículo), isso reforça o potencial antidiarreico do extrato na diarreia induzida por óleo de rícino, estes achados corroboram com os encontrados por Santana (2016) que estudou as propriedades antidiarreica de proteínas do látex.

Em uma tentativa de elucidar os mecanismos relacionados a atividade antidiarreica do extrato etanólico Th-EtOH_f, estudou-se o efeito anti-secretor do extrato realizando o teste de *enteropooling*. Descrito primeiramente por Robert et al. (1976), o *enteropooling* tem como intuito avaliar a geração de fluidos intestinais resultantes da ação das prostaglandinas. O extrato etanólico Th-EtOH_f, nas doses de 10 e 50 mg/kg foi capaz de diminuir significativamente a produção de fluidos intestinais, achados similares foram também encontrados por Prasad et al. (2014) ao estudar o extrato das raízes de *Aconitum heterophyllum* (Ranunculaceae) com o mesmo modelo de experimentação.

O fenômeno de hormese foi observado no decorrer da análise dos resultados obtidos da diarreia induzida por óleo de rícino e no *enteropooling*, este fenômeno tem como característica uma dose-reposta estimulante em doses baixas e inibitória em doses altas, apresentando um gráfico de dose-resposta bifásica e hormética, em forma de U, U invertido (U-shaped) e em forma de J. (CALABRESE; BALDWIN, 2001; CALABRESE; BLAIN, 2011). Esse resultado do estudo do extrato etanólico Th-EtOH_f assemelham-se aos encontrados por Negreiros et al. (2019) em seu estudo sobre a atividade antidiarreica do α -terpineol em camundongos, que ao utilizar o mesmo protocolo obteve como resposta um gráfico dose-resposta em forma de U.

SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispidula* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.

Conforme os resultados encontrados, adotou-se então a dose de 50mg/kg como protótipo para os outros testes.

Com o intuito de avaliar a ação do extrato etanólico Th-EtOH_f no trânsito intestinal, buscamos avaliar seus efeitos na motilidade, usando como ferramenta o carvão ativado, um agente que não é absorvido e devido a sua adsorção impede que haja absorção de drogas e substâncias, é usado como um marcador de distância percorrida ao longo do musculo liso (BELLO; MAIHA; ANUKA, 2016). O resultado inicial obtido neste protocolo constatou que o extrato foi capaz de reduzir significativamente o trânsito intestinal quando estimulado pelo óleo de rícino, e comparado aos efeitos da loperamida.

Com efeitos semelhantes ao da morfina a loperamida (análogo meperidina), é um agonista opióide que exerce seus efeitos nos receptores μ -opióides, localizados no sistema mioenterico (intestino grosso), provocando diminuição do tônus da musculatura lisa, bloqueia a liberação de acetilcolina e minimiza os movimentos peristálticos (LUTTERODT, 1989), buscando avaliar o envolvimento da via opióide, realizou-se então a modulação do trânsito com a naloxona que por sua vez atua sobre os receptores opióides de forma não seletiva, possuindo mais afinidade pelo tipo μ -opióides (KINUTHIA; MURIITHI; MWANGI, 2016), é capaz de antagonizar os efeitos exercidos pela morfina, fentanil e loperamida entre outros (LIU; WITTBRODT, 2002).

Durante a análise da motilidade gastrintestinal, ao utilizar-se a naloxona, notou-se que os animais que receberam o fármaco padrão (loperamida) apresentaram reversão dos efeitos anteriormente observados, demonstrando um aumento da motilidade, no entanto, o extrato etanólico etanólico Th-EtOH_f não apresentou reversão significativa dos seus efeitos permanecendo com o trânsito reduzido, com isso constatou-se que o extrato possui efeitos sobre o trânsito intestinal, de forma a reduzi-lo, constatando desta forma que a ação antidiarreica é independente de um mecanismo opióide na diminuição do trânsito intestinal, um achado importante visto que os fármacos opióides apresentam fortes efeitos colaterais dentre este anorexia, náuseas, vômitos, espasmos na região abdominal, constipação e dor (CAMILLERI; LEMBO; KATZKA, 2017).

Para a investigação de um provável efeito anticolinérgico do extrato etanólico Th-EtOH_f realizou-se o trânsito modulado pela via colinérgica baseado nos experimentos de Morais et al. (2012), a Acetilcolina é liberada pelo sistema nervoso

SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispidula* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/NPPM/CCS/UFPI.

parassimpático e atua fisiologicamente na regulação dos trânsito intestinal, para a análise deste efeito utilizou-se como agente um agonista colinérgico, neste caso o betanecol que atua no estímulo contrátil intestinal ao se ligar aos receptores muscarínicos do tipo M3 (INCE; TURKMEN; YAVUZ, 2011; GAITONDE et al., 2018).

Em nosso estudo, verificou-se que o etanólico Th-EtOH_f (50mg/kg) atuou antagonizando os efeitos promovidos pelo betanecol, atuando de forma a reduzir o trânsito intestinal, de forma semelhante a atropina, um fármaco de referência que atua antagonizando o receptor muscarínico (LÉODIDO, 2017) dessa forma pode se conferir que o extrato etanólico Th-EtOH_f pode estar atuando de forma competitiva pelos receptores muscarínicos do tipo 3, reduzindo significativamente o trânsito intestinal, visto que o trânsito indica somente a distância percorrida pelo marcador. Após esta análise, realizou-se o teste de esvaziamento gástrico em uma tentativa de avaliar uma provável ação cinética do extrato etanólico Th-EtOH_f exerce ação no intestino ou se há envolvimento do estômago nessa ação.

O vermelho de fenol é corante, não absorvível, muito utilizado nos estudos de esvaziamento gástrico, apresenta permeabilidade baixa, menos de 10% é secretado pela urina, foi inicialmente estudado por Gorham (1923), é muito utilizado no modelo de esvaziamento gástrico que consiste em verificar se algum composto atua de forma procinética (HARRISON et al., 2004).

O protocolo de esvaziamento nos possibilitou observar que o extrato não tem atuação no esvaziamento gástrico, visto que não houve retenção significativa do corante no estômago, comprovando o extrato etanólico Th-EtOH_f exerce seus efeitos exclusivamente a nível intestinal, resultados similares foram encontrados por Costa et al., (2016) ao estudar os efeitos do polissacarídeo da alga *Gracilaria caudata* frente ao esvaziamento gástrico. Dado os resultados já obtidos do extrato, buscamos também realizar o modelo de indução de diarreia por Prostaglandinas E₂.

A prostaglandina E₂ é originada do metabolismo da Cox II (ciclooxigenase II), sua síntese inicia com a liberação de AA (ácido araquidônico) dos glicofosfolídeos resultante das ações da fosfolipase que sofre conversão em PH₂ sob ação da ciclooxigenase, trata-se de um valioso mediador inflamatório, com ação sobre a migração leucocitária e angiogênese ao ligar-se aos seus receptores específicos (EP₁, EP₂, EP₃, EP₄), sua atuação na musculatura lisa ocorre através dos receptores EP₃, este quando ativado podem alterar a motilidade intestinal, promovendo perda

SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispidula* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.

hidroeletrolítica para o lúmen do intestino; o modelo diarreico por prostaglandina E₂ promove diarreia de cunho inflamatório (MUKAHERJEE et al., 1998; SHAHBAZIAN et al., 2002; DUANGPROM et al., 2018; NISHIZAWA et al., 2018). Os resultados da avaliação da diarreia induzida por prostaglandina (E₂) não resultaram em diferença estatística, pois quando avaliado o *enteropooling* induzido por PGE₂ verificou-se que não houve redução da geração de fluidos, sugerindo que o extrato etanólico Th-EtOH_f não teria influência sob a diarreia de origem inflamatória.

SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispidula* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.

Conclusão

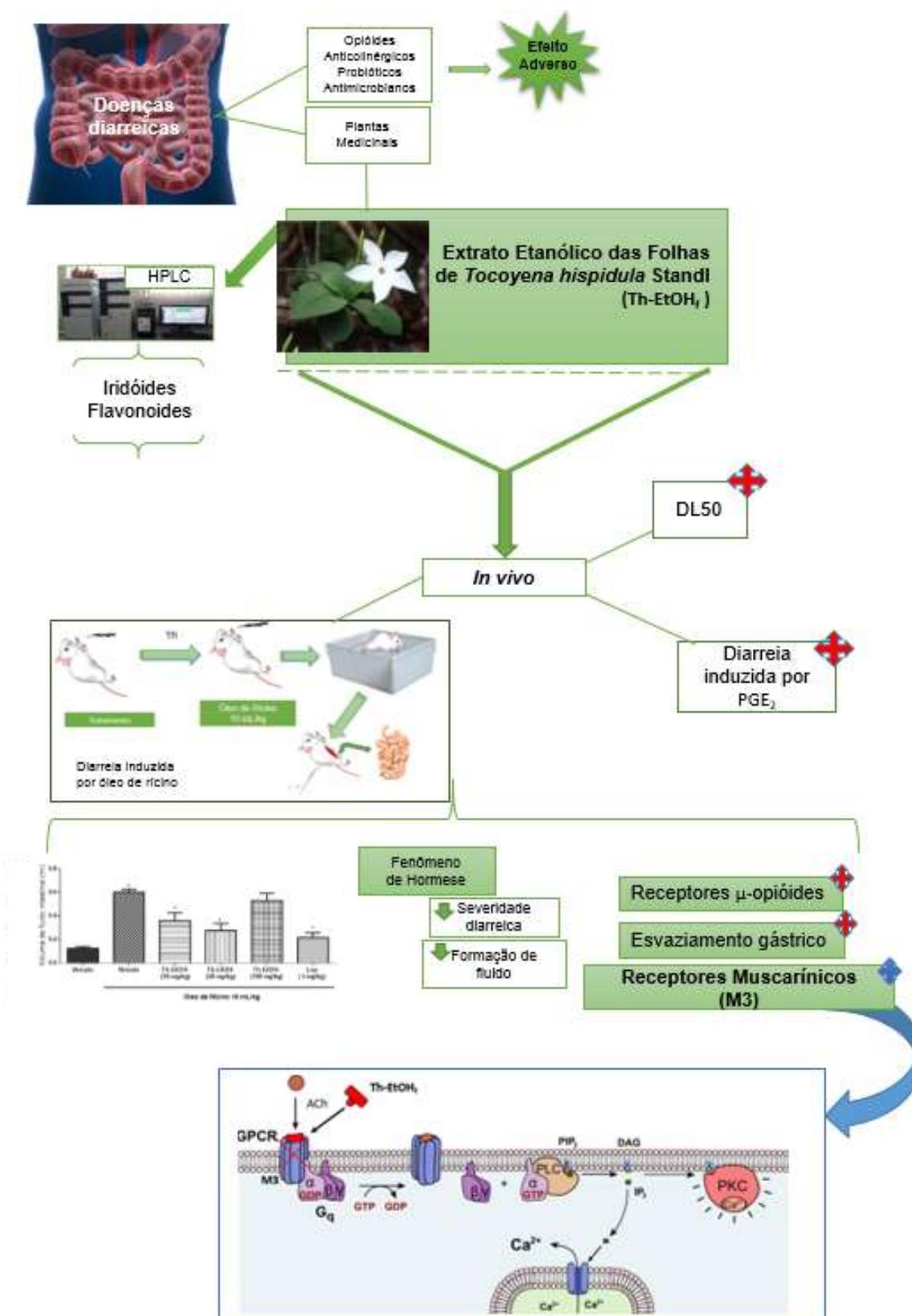
SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispidula* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.

6. CONCLUSÕES

- Quando realizado a caracterização química do extrato etanólico Th-EtOH_f apresentou bandas características das classes dos Iridoides e flavonoides, sendo o primeiro encontrado em abundância no extrato.
- O extrato etanólico Th-EtOH_f não apresentou sinais de toxicidade aguda.
- O extrato etanólico Th-EtOH_f mostrou atividade antidiarreica no modelo de diarreia e *enteropooling* induzido por óleo de ricino, diminuindo significativamente a produção de fluidos intestinais e a quantidade de fezes.
- Ação antidiarreica do extrato etanólico Th-EtOH_f Standl no intestino ocorre devido a uma provável ação como um antagonista de receptores muscarínicos, responsável pela diminuição de fluidos gastrointestinais, bem como da motilidade intestinal, e secreção de íons e água para o lúmen.
- O extrato etanólico Th-EtOH_f não demonstrou efeito sobre o esvaziamento gastrointestinal em camundongos, o que supõe que seus efeitos ocorrem apenas no intestino.
- O extrato etanólico Th-EtOH_f não mostrou ação antidiarreica frente a diarreia induzida por PGE₂

SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispidula* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.

Figura 23 – Mapa conceitual do estudo da atividade antidiarreica do extrato etanólico Th-EtOH_r em camundongo



SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispidula* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.

Perspectivas

SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispidula* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.

PERSPECTIVAS

- ✓ Avaliar o potencial toxicológico de frações obtidas das folhas de *Tocoyena hispidula* Standl. em camundongos;
- ✓ Analisar a existência de efeito antidiarreico das frações obtidas das folhas de *Tocoyena hispidula* Standl. no modelo de diarreia induzida por óleo de rícino e no esvaziamento gástrico em camundongos ;
- ✓ Avaliar a atividade relaxante induzida pelo extrato das folhas de *Tocoyena hispidula* Standl em órgãos isolados de ratos
- ✓ Investigar a atividade espasmolítica do extrato etanólico das folhas *Tocoyena hispidula* Standl em íleo isolados de rato.
- ✓ Investigar a participação dos canais de cálcio no efeito relaxante induzido pelo extrato etanólico das folhas de *Tocoyena hispidula* Standl em íleo isolado de rato.
- ✓ Investigar a participação dos canais de potássio sobre a mediação do efeito relaxante induzido pelo extrato etanólico das folhas de *Tocoyena hispidula* Standl em íleo isolado de rato.

SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispidula* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.

Referências

SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispidula* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.

REFERÊNCIAS

AFROZ, S. et al. Antidiarrhoeal activity of the ethanol extract of *Paederia foetida* Linn. (Rubiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, ed. 1-2, p. 125-130, 2006.

AWOUTERS, F. et al. Loperamide: survey of studies on mechanism antidiarrheal activity. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 38, n. 1, p. 977-995, 1993.

ALTURA, B. M.; ALTURA, B. T. Differential effects of substrate depletion on drug-induced contractions of rabbit aorta. **American Journal Physiology**, v. 219, n. 6, p. 1698-1705, 1970.

ARANDES, S. et al. Travelers' Diarrhea in Children at Risk: An Observational Study From a Spanish Database. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 35, n.4, p.392–395, 2016.

ARAÚJO, T. S. L. Antidiarrheal activity of cashew GUM, a complex Heteropolysaccharide extracted from exudate of *Anacardium occidentale* L. in rodents. **Jounal Ethnopharmacol**, v. 174, n. 1, p. 299-307, 2015.

ARNOLD, R. J.; GABRAIL, N.; RAUT, M. Clinical implications of chemotherapy induced diarrhea in patients with cancer. **The journal of supportive oncology**, v. 3, n. 3, p. 227-232, 2005.

AUTH, M. K. H.; VORA, R.; KOKAI, G. K. Investigation of chronic diarrhoea. **Paediatrics and Child Health**, v. 26, n. 10, p. 423-432, 2016.

AWOUTERS, F. et al. A. Loperamide: survey of studies on mechanism antidiarrheal activity. **Digestive diseases and sciences**, v. 38, n. 1, p. 977-995, 1993.

BAHADUR, S. et al. Traditional use of medicinal plants among local communities in the Peshawar Valley, Pakistan. **Acta Ecologica Sinica**. 2018.

BARFFOUR, M. A. et al. Effects of Daily Zinc, Daily Multiple Micronutrient Powder, or therapeutic Zinc Supplementation for Diarrhea Prevention on Physical Growth, Anemia, and Micronutrient Status in Rural Laotian Children: A Randomized Controlled Trial. **The Journal of Pediatrics**. 2018.

- SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispidula* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.
- BARIWENI, M. W.; YIBALA, O. I.; OZOLUA, R. I. Toxicological studies on the aqueous leaf extract of *Pavetta crassipes* (K. Schum) in rodents. **Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research**, v. 6, n. 1, p. 1-16, 2018.
- BAYDOUN, S. et al. Ethnopharmacological research on medicinal plants used in traditional medicine by communities of Mount Hermon. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 173, p. 139-156. 2015.
- BEATTY, G. W. Diarrhea in Patient Infected with HIV Presenting to the Emergency Department. **Emergency Medicine Clinics of North America**, v.28, n. 2, p.299–310, 2010.
- ROJAS-BEDOLLA, E. I. et al. Chemical characterization, pharmacological effects and toxicity of an ethanol extract of *Celtis pallida* Torr. (Cannabaceae) aerial parts. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 219, p. 126-132, 2018.
- BELDEROK, S.M. et al. Incidence, risk factors and treatment of diarrhea among Dutch travelers: reasons not to routinely prescribe antibiotics. **BMC Infectious Diseases**, v. 11, p. 295, 2011.
- BELLO, F. H.; MAIHA, B. B.; ANUKA, J. A. The effect of methanol rhizome extract of *Nymphaea lotus* Linn. (Nymphaeaceae) in animal models of diarrhoea. **Journal of Ethnopharmacology**, v.190, p. 13-21, 2016.
- BELLO, F. H.; MAIHA, B. B.; ANUKA, J. A. The effect of methanol rhizome extract from *Nymphaea lotus* Linn. (Nymphaeaceae) in animal models of diarrhea. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 190, p. 13-21, 2016.
- BENNETT, J. E.; DOLIN, R.; BLASER, M. J. **Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases**. 8^a ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, p. 1238-1246, 2015.
- BINDER, H. J. et al. Oral Rehydration Therapy in the Second Decade of the Twenty-first Century. **Current Gastroenterology Reports**, v. 16, p. 376, 2014.
- BRANDT, K. G.; DE CASTRO ANTUNES, M. M.; DA SILVA, G. A. P. Acute diarrhea: evidence-based management. **Jornal de Pediatria**, v. 91, n. 6, p. S36- s43, 2015.
- BRASIL, Decreto Nº 5.813, Política Nacional de Plantas Medicinal e Fitoterápico. Diário Oficial da União, nº 119, 23 de junho de 2006. p. 2.

SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispidula* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.

BRASIL, Ministério da Saúde. RENISUS – Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse ao SUS, fevereiro de 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde (MS). Departamento de Informática do SUS (DATASUS). Sistema de Informação de Mortalidade (SIM). Indicadores de mortalidade, 2012. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2012/c06.def>> Acesso em 12 de jan. 2019.

BURG, M. B.; FERRARIS, J. D. Intracellular Organic Osmolytes: Function and Regulation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, p. 7309-7313, 2008.

BURGAIN, J. et al. In vitro interactions between probiotic bacteria and milk proteins probed by atomic force microscopy. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 104, p. 153-162, 2013.

CALABRESE, E. J.; BALDWIN, L. A. Hormesis: U-shaped dose responses and their centrality in toxicology. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 22, ed. 6, p. 285-291, 2001.

CALABRESE, E. J.; BLAIN, R. B. The hormesis database: The occurrence of hormetic dose responses in the toxicological literature. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 61, ed. 1, p. 73-81, 2011.

CAMILLERI, M.; LEMBO, A.; KATZKA, D. A. Opioids in gastroenterology: treatment of adverse effects and creation of therapeutic benefits. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 15, ed. 9, p. 1338-1349, 2017.

CANÇADO, G. G. L. et al. Clinical epidemiology of *Clostridium difficile* infection among hospitalized patients with antibiotic-associated diarrhea in a university hospital of Brazil. **Anaerobe**, v. 54, p. 65-71, 2018.

CARMO, L. F. et al. Concentração de Sódio e Glicose em soro de Reidratação Oral preparados por agentes comunitários de saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 17, n. 2, p. 445-452, 2012.

CARRERAS, L.; MIGUEL, M.; ALEXANDRE, A. Beneficial health properties of iridoids terpenes. **Nutrición clínica dietética hospitalaria**. v. 32, ed. 3, p.81-91. 2012.

- SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispidula* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.
- CHANG, I. M. et al. Protective activities of AU against carbon tetrachloride- induced liver damage in mice. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 6, p. 443-453, 1983.
- COELHO, V. P. M.; AGRA, M. F.; BARBOSA, M. R. V. Estudo farmacobotânico das folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schltdl.) K.Schum. (Rubiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 16, n. 2, p. 170-177, 2006.
- COSTA, D. S. et al. Sulphated Polysaccharide Isolated from the Seaweed *Gracilaria caudata* Exerts an Antidiarrhoeal Effect in Rodents. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 118, n. 6, p. 440-448, 2016.
- COSTA, Douglas Soares da. **Atividade antidiarreica de uma fração polissacarídica sulfatada extraída de *Gracilaria caudata* (J Agardh) em roedores (2016)**. Dissertação de Mestrado- Programa de Pós-graduação em Farmacologia- Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2016.
- DE OLIVEIRA, A. P. et al. Influence of light intensity, fertilization and season on the content of cirsiolol, a chemical marker of *Leonotis nepetifolia* (Lamiaceae). **PeerJ**. 2019.
- DE SALES, I. R. P. et al. *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae), a medicinal plant, presents antimotility and antidiarrheal activity in vivo. **BMC complementary and alternative medicine**, v.15, p. 253. 2015.
- DE SOUSA, E. A. et al. Composição química e atividade antileishmania de *Tocoyena hispidula*. **Química Nova**, v. XY, p. 1-5, 2018.
- DELPETE, P. G.; JARDIM, J. G.; Sistemática, taxonomia e florística das Rubiaceae brasileiras: uma visão geral sobre o status atual e desafios futuros. **Rodriguésia**, v. 63, n. 01, p. 101, 2012.
- DEMIREZER, L. O. et al. Iridoids, Flavonoids and Monoterpene Glycosides from *Galium verum* subsp. *verum*. **Turkish Journal of Chemistry**, v.30, p. 525-534, 2006.
- DI CARLO, G. D. et al. Effects of quercetin on gastrointestinal tract in rats and mice. **Phytotherapy Research**, v. 8, n. 1, p. 42-44, 1994.
- DINDA, B.; DEBNATH, S.; BANIK, R. Naturally occurring iridoids and secoiridoids. An update review, part 4. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 59, ed. 7, p. 803-832, 2011.

SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispidula* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.

DINESEN, L.; HARBORD, M. Acute diarrhea. **Medicine**, v. 41, n. 2, p. 104-107, 2013.

DONOWITZ, M. et al. Translational Approaches for Pharmacotherapy Development for Acute Diarrhea. **Gastroenterology**, v. 142, p. e1-e9, 2012.

DUANGPROM, S. et al. Identification and expression of prostaglandin E synthase (PGES) gene in the central nervous system and ovary during ovarian maturation of the female mud crab, *Scylla olivacea*. **Animal Reproduction Science**, v. 198, p. 220-232, 2018.

EGGLESTON, W.; CLARK, K.; MARRAFFA, J. Loperamide Abuse Associated with Cardiac Dysrhythmia and Death. **Annals of Emergency Medicine**, v. 69, p. 83-86, 2017.

EPA – ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. HEALTH EFFECTS. TEST GUIDELINES. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances (OCSPP) Harmonized Test Guidelines - Master List. Disponível em: < <https://www.regulations.gov> >. Acessado em: Setembro de 2017.

ERICSSON, C. D. Prevenção da Diarreia dos Viajantes Prevention of Travelers' Diarrhea. **Travel Medicine**, 4º ed., p. 199-204, 2019.

ESTRADA-SOTO, S. et al. Spasmolytic action of *Lepechinia caulescens* is through calcium channel blockade and NO release. **Journal Ethnopharmacology**, v.114, p. 364–370, 2007.

FARIAS, R. R. S.; CASTRO, A. A. J. F. Fitossociologia de trechos da vegetação do Complexo de Campo Maior, Campo Maior, PI, Brasil. **Acta Botanica. Brasilica**. v.18, n.4, 2004.

FERNÁNDEZ-BANÁRES, F. et al. Chronic diarrhoea: Definition, classification and diagnosis. **Gastroenterología y Hepatología**, v. 39, n. 8, p. 535-559, 2016.

FONSECA, O. C. **Avaliação das atividades espasmolítica e antidiarreica de *Platonia insignis* Mart. (Clusiaceae) em roedores (2017)**. Dissertação de Mestrado em Farmacologia - Programa de Pós-graduação em Farmacologia- Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2017.

SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispidula* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.

FORNAI, M. et al. Effects of a bicarbonate-alkaline mineral water on digestive motility in experimental models of functional and inflammatory gastrointestinal disorders. **Methods Findings Experimental and Clinical Pharmacology**, v. 30, p. 1-9, 2008.

FRANCESCHI, F. et al. Management of Acute Diarrhea: current and future trends. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 18, n. 1, p. 2065-2069, 2014.

FU, Z. et al. Study of Iridoid glycoside fragmentation patterns in Fructus Gardeniae by HPLC-Q / TOF-MS / MS. **Biomedical Chromatography**. v. 28, ed 12, p. 1795-1807, 2014.

GAITONDE, S. et al. Bethanechol: Is it still being prescribed for bladder dysfunction in women?. **International Journal of Clinical Practice**, 2018.

GALE, A. R.; WILSON, M. Diarrhea: Initial Evaluation and Treatment in the Emergency Department. **Emergency Medicine Clinics of North America**, v. 34, n. 2, p. 293-308, 2016.

GHISALBERTI, E. L. Biological and pharmacological activity of naturally occurring iridoids and secoiridoids. **Phytomedicine**, v. 5, ed 2, p. 147-163, 1988.

GORHAM, F. D. The dilution factor in gastric analysis. **Jama**, v. 81, p. 1738-1742, 1923.

GRIGGS, D. W. et al. Pharmacologic Comparison of Clinical Neutral Endopeptidase Inhibitors in a Rat Model of Acute Secretory Diarrhea. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 357, n. 2, p. 423–431, 2016.

GUERRANT, R. L. et al. Practice Guidelines for the Management of Infectious Diarrhea. **Clinical Infectious Disease**, v. 32, n. 3, p. 331-351, 2001.

HAMMER, G; MCPHEE, S. Fisiopatologia da Doença. Uma Introdução à Medicina Clínica, 7. ed. Porto Alegre: **Artmed**, 2016.

HARRISON, A. P. et al. Gastrointestinal-tract models and techniques for use in safety pharmacology. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 49, n. 1, p. 187-199, 2004.

SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispidula* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.

HOLMGREN, J.; LUNDGREN, A. Diarrhea Caused by Bacteria. In: PLOTKIN, S. A. et al. **Plotkin's Vaccines**: 7. ed. Philadelphia: Elsevier, p. 252–260, 2018. Disponível em://www.elsevier.com/books/plotkinsvaccines/9780323357616.
Acesso em: 02 janeiro 2019.

HUMPHREY, J. H. Child undernutrition, tropical enteropathy, toilets, and handwashing. **The Lancet**, v. 374, n. 9694, p.1032 – 1035, 2009.

INCE, S.; TURKMEN, R.; YAVUZ, H. The effect of boric acid on acetylcholine, bethanechol and potassium-evoked responses on ileum of rat. **Autonomic & Autacoid Pharmacology**, v. 31, n. 3-4, p. 50-56, 2011.

JAISWAL, S. K. et al. Evolution of iridoid glycosides from leave of *Barleia Prionittis* as na Anti-diarrhoeal Activity: an Ethnopharmacological study. **International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 2, ed. 3, p. 680-686, 2010.

Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB14335>. Acesso em: dez. 2018.

KAMATO, D. et al. Structure, function, pharmacology, and therapeutic potential of the G protein, $G\alpha/q$, 11. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, v. 2, n. 1, p. 1-11, 2015.

KAMUCHAKI, J.M. et al. Efficacy of glutamine supplementation on the outcome of children admitted with persistent diarrhea in Uganda: A randomized controlled study. **Paediatrics & Child health**, v. 18, n. 1, p. e1, 2013.

KELLY, L.; JENKINS, H.; WHYTE, L. Pathophysiology of diarrhoea. **Paediatrics and Child Health**, v. 28, n. 11, p. 520-526, 2018.

KELLY, P. Infectious diarrhoea. **Medicine**, v. 39, p. 202–206, 2011.

KENT, A.; BANKS, M. Pharmacological management of diarrhea. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 39, n. 3, p. 495-507, 2010.

KING, C. K. et al. Managing acute gastroenteritis among children: oral rehydration, maintenance, and nutritional therapy. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.52, n. 16, p. 1-16, 2003.

SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispidula* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.

KINUTHIA, D. G.; MURIITHI, A. W.; MWANGI, P. W. Lyophilized extracts from *Bidens biternata* (Lour.) Merr. and sheriff. They show significant antidiarrheal activity in in vivo models of diarrhea. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 193, p. 416-422, 2016.

KOPKE, M. A.; RUAUX, C.G.; GAL, A. Myenteric ganglionitis and intestinal leiomyositis in a Jack Russell terrier. **Journal of Small Animal Practice**, 2018.

LACY et al. Bowel Disorders. **Gastroenterology**, v. 150, n. 6, p. 1393- 1407, 2016.

LALANI, T. et al. Epidemiology and Self-Treatment of Travelers' Diarrhea in a Large, Prospective Cohort of Department of Defense Beneficiaries. **Journal of Travel Medicine**, v. 22, n. 3, p. 152-160, 2015.

LEÃO, R. B. A.; FERREIRA, M. R. C.; JARDIM, M. A. G. Levantamento de plantas de uso terapêutico no município de Santa Bárbara do Pará, Estado do Pará, Brasil. **Revista Brasileira Farmácia**, v. 88, n. 1, p. 21-25, 2007.

LEÓDIDO, A. C. M. et al. Antidiarrheal therapeutic potential and safety evaluation of the sulfated polysaccharide fraction of the *Gracilaria intermedia* algae in mice. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 97, p. 34-35, abr. 2017a.

LEÓDIDO, ANA CAROLINA MACHADO. **Avaliação pré-clínica de uma fração polissacarídica sulfatada obtida da alga marinha *Gracilaria intermedia* (Jagardh) como candidata a fármaco para o tratamento de diarreias agudas**. 2017. Tese de Doutorado - Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) - Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, 2017b.

LI, C. et al. Analysis of iridoid glucosides in *Hedyotis diffusa* by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, n.48, 205–211, 2008.

LI, S. et al. Changes in the Small Intestine Trauma Neurons in a Rat Model of Irritable Bowel Syndrome with Diarrhea. **Journal Neurogastroenterol Motil**, v. 22, p. 310-320, 2016.

LINS, M. P. G; MEDEIROS, V. M de. Avaliação do uso de plantas medicinais no tratamento de doenças gastrointestinais na cidade de Nazarezinho – PB. **Revista Interdisciplinar em Saúde**, v. 2, n. 1, p. 75-98, 2015.

SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispidula* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.

LIU, J. Applymet of Spleen-deficiency theory in functional diarrhea. **Global Traditional Chinese Medicine**, v. 10, p. 461-464, 2017.

LIU, L. et al. 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.

LUKACIK, M; THOMAS, R. L.; ARANDA, J. V. A meta-analysis of the effects of oral zinc in the treatment of acute and persistent diarrhea. **Pediatrics**, v. 121, n. 2, p. 236-36, 2008.

LUTTERODT. Folha de *Psidium guajava* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 25, p. 235, 1989.

MAJORS, R. E. Column Technology for Modern High Performance Liquid Chromatography (HPLC). **Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering**. 2018.

MARSANGO, S. et al. Muscarinic receptor oligomerization. **Neuropharmacology**, v. 136, p. 401-410, 2018.

MARTINS, D.; NUNEZ, C. V. Secondary Metabolites from Rubiaceae Species. **Molecules**, v. 20, p.13422- 13495, 2015.

MASCOLO, N. et al. Inhibitors of nitric oxide synthetase prevent castor-oil induced diarrhoea in the rat. **British Journal of Pharmacology**, v. 108, n. 4, p. 861-864, 1993.

MATHAN, V. I. Diarrhoeal diseases. **British Medical Bulletin**, v. 54, n.1, p. 407-419, 1998.

MCMAHAN, Z.H.; DUPONT, H.L. Review article: the history of acute infectious diarrhoea management – from poorly focused empiricism to fluid therapy and modern pharmacotherapy. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 25, p. 759 – 769, 2007.

MENOZZI, A. et al. Role of muscarinic receptors in the contraction of jejunal smooth muscle in the horse: An in vitro study. **Research in Veterinary Science**, v. 115, p. 387- 392, 2017.

SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispidula* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.

MESSIAS, M.C.T.B. et al. Popular use of medicinal plants and the socioeconomic profile of the users: a study in the urban area of Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.17, n.1, p.76-104, 2015.

MIYAGOSHI, M.; AMAGAYA, S.; OGIHARA, Y. Choleric actions of iridoid compounds. **Pharmacobiodyn**, v.11, p.186-189, 1988.

MORAIS, T. C. Mangiferin, a natural xanthone, accelerates gastrointestinal transit in mice involving cholinergic mechanism. **World Journal of Gastroenterology**, v. 18, n. 25, p. 3207-3214, 2012.

MOTLHATLEGO, K.E.; MFOTIE NJOYA, E.; ABDALLA, M.; ELOFF, A. J.N.; MCGAW, L.J. The potential use of leaf extracts of two *Newtonia* (Fabaceae) species to treat diarrhoea. **Jornal Sul Africano de Botânica**, v. 116, p. 25- 33, 2018.

MCKAY, D. M.; MACNAUGHTON, W. K. Mecanismos e Consequências da Inflamação Intestinal. Mechanisms and Consequences of Intestinal Inflammation. **Physiology of the Gastrointestinal Tract**, v. 2, p. 2075- 2099, 2012.

MUKHERJEE, P.K. et al. Screening of anti-diarrhoeal profile of some plant extracts of a specific region of West Bengal, India. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 60, n. 1, p. 85–89, 1998.

MUNOS, M. K.; FISCHER-WALKER, C. L.; BLACK, R. E. The effect of rotavirus vaccine on diarrhoea mortality. **International journal of epidemiology**, 2010.

MURUGESAN, S. et al. Nutritional and therapeutic benefits of medicinal plant *Pithecellobium dulce* (Fabaceae): A review. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 0, p. 001-010, 2019.

NAGULA, R. L; WAIRKAR, S. Recent advances in topical delivery of flavonoids: A review. **Journal of Controlled Release**. v. 296, p. 190-201, 2019.

NEGREIROS, P. S. et al. Antidiarrheal activity of α -terpineol in mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 110, p. 631-640, 2019.

NEGREIROS, Polyanna dos Santos. **Eficácia do monoterpeno α -terpineol na atividade antidiarreica em roedores (2018)**. Dissertação de Mestrado- Programa de Pós-graduação em Farmacologia- Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2018.

SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispidula* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.

NETO, O. Z.; BATISTA, E. A. C.; MEIRELLES, A. J. A. The use of ethanol as solvent to extract Brazil nut oil. **Cleaner Production Journal**. v. 180, p. 866-875, 2018.

NISHIZAWA, N. et al. Inhibition of microsomal prostaglandin E synthase-1 facilitates liver repair after hepatic injury in mice. **Journal of Hepatology**, v. 69, n. 1, p. 110-120, 2018.

OCHOA, T. J.; SALAZAR- LINDO, E.; CLEARY, T.G. Management of children with infection-associated persistent diarrhea. **Seminars in Pediatric Infectious Diseases**, v. 15, n. 4, p. 229- 236, 2004.

UGWAH-OGUEJIOFOR, C. J. U. et al. Acute and sub-acute toxicity of aqueous extract of aerial parts of *Caralluma dalzielii* N. E. Brown in mice and rats. **Heliyon**, v. 5, n. 1, 2019.

OLIVEIRA, J. A. *Tocoyena* in **Lista de espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB14335>, acessado em dezembro 2018.

PANDHARE, R. B. et al. Antidiarrheal activity of *Clitorea ternatea* Linn. (Fabaceae) ethanol leaf extract in rats. **An International Quarterly Journal of Research in Ayurveda**. v. 39, ed 1, p. 40-45, 2018.

PANNEMANS, J.; CORSETTI, M. Opioid receptors in the GI tract: targets for treatment of both diarrhea and constipation in functional bowel disorders?. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 43, p. 53-58, 2018.

PARANJPE, R. et al. *Piper Betel* Leaf Extract: Anti-cancer benefits and bio-guided fractionation to identify active principles for the treatment of prostate cancer. **Carcinogenesis**, v. 34, ed 7, 2013.

PASSARIELLO, A. et al. Efficacy of a New Hypotonic Oral Rehydration Solution Containing Zinc and Prebiotics in the Treatment of Childhood Acute Diarrhea: A Randomized Controlled Trial. **The Journal of Pediatrics**. v.158, p.288-92, 2011.

PATEL, K.; THILLAINAYAGAM, A. V. Diarrhoea. **Medicine**, v. 37, p. 23–27, 2011.
PESSOA, H. L. F. et al. Avaliação da toxicidade aguda, efeitos citotóxico e espasmolítico de *Pomacea lineata* (Spix, 1827) (Mollusca, Caenogastropoda). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 76-82, 2007.

SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispidula* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.

PRASAD, S. K.; JAIN, D.; PATEL, D. K.; SAHU, A. N.; HEMALATHA, S. Antisecretory and antimotility activity of *Aconitum heterophyllum* and its significance in treatment of diarrhea. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 46, p. 82-87, 2014.

QNAIS, E.Y. et al. Antidiarrheal Activity of the Aqueous Extract of Punica granatum. (Pomegranate) Peels. **Pharmaceutical Biology**, v. 45, n. 9, p. 715-720, 2007.

QI, X.; TESTER, R. F. Utilisation of dietary fibre (non-starch polysaccharide and rent starch) molecules for diarrhoea therapy: A mini-review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 122, p. 572-577, 2019.

QI, X.; TESTER, R.F. Starch containing formulations for diarrhoea therapy. **Clinical Nutrition ESPEN**, v.28, p. 36-40, 2018.

RAO, D. C. et al. Non-polio enterovirus association with persistent diarrhea in children as revealed by a follow-up study of an Indian cohort during the first two years of life. **Journal of Clinical Virology**, v.61, n.1, 2014.

RAO, M. C. Oral Rehydration Therapy: New Explanations for an Old Remedy. **Annual Review of Physiology**, v. 66, p. 385-417, 2004.

RAWAT, P.; SING, P. K.; KUMAR, V. Evidence based traditional anti-diarrheal medicinal plants and their phytochemicals. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 96, p. 1453-1464, 2017.

REGNARD, G. et al. Loperamide: Therapeutic Reviews. **Journal of Pain and Symptom Management**, v. 42, n. 2, p. 319-323, 2011.

RENGASAMY, K. R. R. et al. The role of flavonoids in autoimmune diseases: Therapeutic updates. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 194, p. 107-131, 2019.

REYNELL, P. C.; SPRAY, G. H. The simultaneous measurement of absorption and transit in the gastrointestinal tract of the rat. **Journal of Physiology**, v. 15, n. 1, p. 361-371, 1978.

ROBERT, A. et al. Enteropooling Assay: a test for diarrhea produced by prostaglandins. **Prostaglandins**, v. 11, n.5, p. 809-828, 1976.

SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispidula* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.

ROBERTO, J. V. B. et al. Parâmetros bioquímicos de referência de ratos wistar de diferentes faixas de peso, provenientes do biotério das faculdades Nova Esperança-PB. **Revista de Ciências da Saúde Nova Esperança**, v. 16, n. 1, 2018.

ROERIG, J. L. et al. Laxative Abuse: Epidemiology, Diagnosis and Management. **Drugs**, v. 70, n. 12, p. 1487-1503, 2010.

SANDERS, J. W. et al. Epidemiology of Travelers' Diarrhea. **Travel Medicine**, ed. 4, p. 187-198, 2019.

SANTOS, P. L. et al. Citronelol, a monoterpene alcohol with promising pharmacological activities - A systematic review. **Food Toxicology and Chemistry**. v.123, p. 459-469, 2019.

SANTANA, Lucas de Araújo Bastos. **Avaliação da atividade antidiarreica de proteínas do látex de *Plumeria pudica* (JACQ, 1760)(2016)**. Dissertação de Mestrado- Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia- Universidade Federal do Piauí, 2016.

SCHILLER, L. R. Chronic diarrhea. **Current Treatment Options in Gastroenterology**, v. 8, n. 3, p. 259-266, 2005.

SCHILLER, L. R.; PARDI, D. S.; SELLIN, J. H. Chronic Diarrhea: Diagnosis and Management. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 15, n. 2, p. 182-193.e3, 2017.

SCHULTZ, S. G.; CURRAN, P. F. Coupled transport of sodium and organic solutes. **Physiological Reviews**, v.50, p. 637-718, 1970.

SERI, C. S. et al. Two new iridoid glycosides from *Morinda morindoides* (Rubiaceae). **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 6, ed. 1, p. 01-04, 2017.

SESAPI – Secretaria Estadual de Saúde Piauí. Disponível em: <<http://www.saude.pi.gov.br/noticias/2014-05-09/5841/diarreia-mata-uma-crianca-acada-15-segundos-em-todo-o-mundo.html>> Acesso em 14 de jan. 2019a.

SESAPI – Secretaria Estadual de Saúde Piauí. Disponível em: <<http://www.saude.pi.gov.br/sim>> Acesso em 17 de jan. 2019b.

- SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispidula* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.
- SHAHBAZIAN, A., et al. Differential peristaltic motor effects of prostanoid (DP, EP, IP, TP) and leukotriene receptor agonists in the guinea pig isolated small intestine. **British Journal of Pharmacology**, v. 137, p. 1047–1054, 2002.
- SHOBA, F. G.; THOMAS, M. Study of antidiarrhoeal activity of four medicinal plants in castor-oil induced diarrhoea. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, ed. 1, p. 73-76, 2001.
- SILVA, L. M. P. et al. Isolation and Identification of the Five New Flavonoids of *Genipa americana* Leaves. **Molecules**, v. 23, ed. 10, 2018.
- SMITH, J. A. W. Post-infective diarrhoea. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 14, n. 5, p. 567-571, 2001.
- SOUKOULIS, C. et al. Compositional and physicochemical factors governing the viability of *Lactobacillus rhamnosus* GG embedded in starch-protein based edible films. **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 876-887, 2016.
- SOUSA, E. A. et al. Composição Química e Atividade Antileishmania de *Tocoyena hispidula*. **Química Nova**, v.42, n.2, 2019.
- SOUKOULIS, C. et al. Stability of *Lactobacillus rhamnosus* GG incorporated in edible films: Impact of anionic biopolymers and whey protein concentrate. **Food Hydrocolloids**, v. 70, p. 345-355, 2017.
- SOUSA, N. A. et al. The efficacy of a sulphated polysaccharide fraction from *Hypnea musciformis* against diarrhea in rodents. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 86, p. 865-875, 2016.
- SOUZA, D. et al. Ethnobotanical, phytochemical and pharmacological aspects Rubiaceae species in Brazil. **Revista Cubana de Plantas Medicinales, Ciudad de la Habana**, v. 18, n. 1, p. 140-156, 2013.
- SOUZA, C. M. P. et al. Utilização de Plantas Mediciniais com Atividade Antimicrobiana por Usuários do Serviço Público de Saúde em Campina Grande – Paraíba. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 2, p. 188-193, 2013.
- SOUZA-MOREIRA, T. M. et al. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, n. 3, p. 435-440, 2010.

SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispidula* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.

STEFFEN, R. Epidemiology of travellers' diarrhea. **Journal of Travel Medicine**, v. 24, n.1, p. S2–S5, 2017.

STEFFEN, R.; COLINA, D. R.; DUPONT, H. L. Traveler's Diarrhea: a clinical review. **JAMA**, v. 313, p. 71-80, 2015.

SPRINGFIELD, E.P. EAGLES, P.K.F., Scott G Quality assessment of South African herbal medicines by means of HPLC fingerprinting. **Journal Ethnopharmacol**, v.101, p. 75-83, 2005.

TANDUKAR, S. et al. E. Co-Infection by Waterborne Enteric Viruses in Children with Gastroenteritis in Nepal. **Healthcare**, v. 7, n. 9, 2019.

TASNEEM, S. et al. Molecular Pharmacology of Inflammation: medicinal plants as anti-inflammatory agents. **Pharmacological Research**. v. 139, p. 126-140, 2019.

THIAGARAJAH, J. R.; DONOWITZ, M.; VERKMAN, A. S. Secretory diarrhoea: mechanisms and emerging therapies. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 12, n. 8, p. 446–457, 2015.

THIAGARAJAH, J. R. et al. Advances in Evaluation of Chronic Diarrhea in Infants. **Gastroenterology**, v. 154, n.8, p. 2045-2059, 2018.

TROPINI, C. et al. Transient Osmotic Perturbation Causes Long-Term Alteration to the Gut Microbiota. **Cell press**, v. 173, n. 7, p. 1742-1754.e17, 2018.

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

UNICEF. **UNICEF e OMS lançam relatório sobre diarreia, a segunda maior causa de mortalidade infantil**. 2015. Disponível em: <http://unicef.org/brazil/pt/media_16165.htm>. Acessado em: 20 de novembro de 2018.

UWADA, J. et al. Activation of muscarinic receptors prevents TNF- α -mediated intestinal epithelial barrier disruption through p38 MAPK. **Cellular Signalling**, v. 35, p. 188-196, 2017.

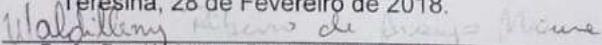
SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispidula* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.

VANACLOCHA, B.; CAÑIGUERAL FOLCARÀ, S. (EDS.). **Fitoterapia: vade mécum de prescripción**. 4. ed. Barcelona: masson, 2003. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/282154691_Fitoterapia_Vademecum_de_Prescripcion>. Acessado em: jan. 2019.

YANG, R. et al. Separation of five iridoid glycosides from *Lonicerae Japonicae* Flos using high-speed countercurrent chromatography and its anti-inflammatory and antibacterial activities. **Molecules**, v. 24, ed.1, 2019.

SOUSA, S. S. Atividade antidiarreica do extrato etanólico da folha de *Tocoyena hispidula* Standl (Rubiaceae) em camundongos (2019). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/ NPPM/ CCS/ UFPI.

ANEXO I

 <p>MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ PRÓ-REITORIA DE PESQUISA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</p> <p>Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil, CEP: 64049-550 Telefone (86) 3215-5734 _e-mail: ceeapi@ufpi.edu.br</p> 	
CERTIFICADO	
<p>Certificamos que a proposta intitulada "Investigação da atividade antidiarreica e espasmolítica de extratos e frações obtidos da planta <i>Tocoyena hispidula</i> Standl e seus derivados bioativos em aorta, traqueia e ileo isolados de rato", registrada nº 440/18, sob a responsabilidade da Profa. Dra. RITA DE CÁSSIA MENESES OLIVEIRA do Departamento Farmacologia/CCS/UFPI que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), 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 de 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 28/02/2018.</p>	
Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	Maio/ 2018 à Março/ 2019
Espécie/Linhagem/raça	1. Camundongo heterogênico/ Swiss 2. Rato heterogênico/ wistar
Nº de Animais	1. 114 2. 324
Peso/ Idade	1. 25-30g 2. 150-300g
Sexo	Machos ou Fêmeas
Origem	Biotério Setorial da UFPI.
<p>Teresina, 28 de Fevereiro de 2018.</p> <p> Profa. Dra. Waldileny Ribeiro de Araújo Moura Coordenador em Exercício da CEUA/UFPI</p>	