



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

POLYANNA DOS SANTOS NEGREIROS

**ATIVIDADE ANTIDIARREICA DO MONOTERPENO α -TERPINEOL EM
ROEDORES**

TERESINA – PI

2018

POLYANNA DOS SANTOS NEGREIROS

**ATIVIDADE ANTIDIARREICA DO MONOTERPENO α -TERPINEOL EM
ROEDORES**

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

Orientadora: Profa. Dra. RITA DE CÁSSIA MENESES OLIVEIRA

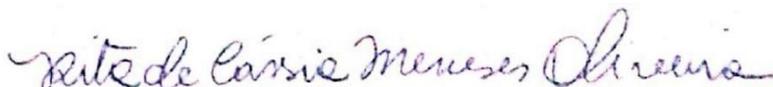
**TERESINA – PI
2018**

POLYANNA DOS SANTOS NEGREIROS

**ATIVIDADE ANTIDIARREICA DO MONOTERPENO α -TERPINEOL EM
ROEDORES**

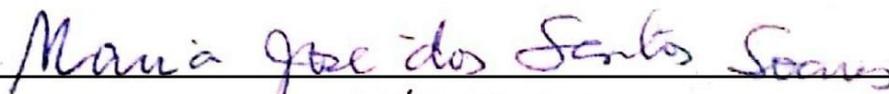
APROVADA 06/07/2018

BANCA DE EXAMINADORA



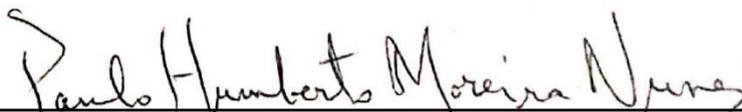
Profa. Dra. Rita de Cássia Meneses Oliveira

(Orientadora) - UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ



Profa. Dra. Maria José dos Santos Soares

(Examinadora interna) - UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ



Prof. Dr. Paulo Humberto Moreira Nunes

(Examinador externo) – UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí Biblioteca
Setorial do CCS
Serviço de Processamento Técnico

N385a Negreiros, Polyanna dos Santos.
Atividade antidiarreica do monoterpeno α -terpineol em roedores /
Polyanna dos Santos Negreiros. – – Teresina, 2018.
100 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia, 2018.
Orientação: Profa. Dra. Rita de Cássia Meneses Oliveira.
Bibliografia

1. Monoterpenos. 2. Óleo de Rícino. 3. Prostaglandina E2. 4.
Cólera. 5. Receptor GM1. I. Título.

CDD 615.32

Agradecimientos

Agradeço primeiramente a DEUS, que está presente em todos os momentos da minha vida, por ter me presenteado com pessoas que me ajudaram chegar até aqui, pela possibilidade de realização deste sonho, por ser meu refúgio diante das dificuldades e meu guia durante esta trajetória com a certeza de que em minha caminhada eu nunca estive sozinha.

À Universidade Federal do Piauí – UFPI, pela acolhida desde a graduação, pelo suporte para realização de pesquisas e ensino.

Ao Núcleo de Pesquisa em Plantas Medicinais e Programa de Pós Graduação em Farmacologia, pelos ensinamentos e desafios propostos durante o Mestrado.

À CAPES, pelo financiamento concedido para o desenvolvimento desta pesquisa.

Agradecer especialmente à minha orientadora Profa. Dra. Rita de Cássia Meneses Oliveira, pela confiança, incentivo, ensinamentos repassados, pelo tempo dedicado a me orientar, pela preocupação e principalmente pelo carinho, pois foi muito mais que uma orientadora, se tornou minha “Mãe Científica”.

Aos meus pais, pelo amor, incentivo, pelos ensinamentos, educação e esforço, pois tudo que sou devo a eles, que sempre estiveram ao meu lado, renunciando sonhos para que eu pudesse realizar os meus. Obrigada pela dedicação incondicional, vocês são minha inspiração e meu melhor presente.

À minha irmã Fabyanna, por compartilhar todos os momentos de felicidade, nervosismo e de dificuldades ao meu lado. Obrigada por alegrar meus dias, apoiar, cuidar, incentivar e acreditar em mim, e sempre estar vibrando pelas minhas conquistas.

Ao meu namorado Jeová, pelo amor, companheirismo, preocupação e paciência durante o Mestrado. Por ser tão presente, acompanhando todos os momentos felizes e sempre me transmitir tranquilidade, pois sem você esses dias teriam sido bem mais difíceis.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia: Profa. Dra. Fernanda Regina de Castro Almeida, Profa. Dra. Aldeídea Pereira de Oliveira, Profa. Dra. Salete Maria da Rocha Cipriano Brito, Profa. Dra. Maria José dos Santos

Soares, Prof. Dr. Francisco de Assis Oliveira, Prof. Dr. Amilton Paulo Raposo Costa, Prof. Dr. Fernando Aécio de Amorim Carvalho, Prof. Dr. Moisés Tolentino Bento da Silva, Elisangela Claudia Alves de Oliveira e em especial a Profa. Dra. Rosimeire Ferreira dos Santos, pelo incentivo à pesquisa científica e docência, aos ensinamentos transmitidos durante as disciplinas e o carinho de todos vocês.

Ao LafiDG, Prof. Dr. Jand Venes Rolim Medeiros pela colaboração na realização do trabalho. Obrigada à Beatriz e Thiago pelo apoio, receptividade e carinho.

Ao Prof. Dr. Paulo Humberto Moreira Nunes, pela prestatividade e paciência ao tirar minhas dúvidas quando necessitei.

Aos amigos de turma de mestrado Ana Rita, Rodrigo, Izabela, Ruan, Simone Erick, Aline, Layane, Karol, Yara e Sávio, vocês são a melhor turma que eu poderia ter. Passamos por muitos momentos difíceis, mas juntos conseguimos enfrentar todos os obstáculos. Então fica a certeza de que cada um contribuiu para o crescimento um do outro, agradeço pelo incentivo, pelos grupos de estudo, pelo carinho, pelos momentos de diversão e pela amizade verdadeira.

Aos companheiros do LabGastro, Valdelânia, Teresa, Daniel, Lorranya, Thayane, Francilene, Maysa, Layane, Oscar, Rafael, Ian, Joselma, Joseane, Suylane e em especial ao Douglas pela ajuda concedida na execução dos trabalhos, pela dedicação, harmonia, pelos momentos de descontração nos intervalos dos experimentos, e principalmente pela amizade.

Aos amigos que fiz no NPPM, Everton, Celiane, Benedito, Bruno, Michel, Raísa, Mickael, Juliana, Alessandra, Monique, José Vítor, Pedro, obrigada pelo carinho e ajuda em todos os momentos que precisei.

Aos funcionários do NPPM e do Biotério, Josi, Patrícia, Gleyce, Seu Carlos, Kalina e dona Rosilda pela prestatividade, carinho e atenção.

Aos meus avós maternos Leontina e Vicente, meus avós paternos Maria das Dores e João da Cruz (*In memoriam*) pelas orações e amor que se sempre tiveram por mim.

Aos meus primos Fatinha, David e Maria, pelos momentos de descontração e pela paciência durante os períodos mais difíceis durante o mestrado.

Aos meus tios, tias, primos, padrinhos, afilhados, amigos e a família do meu namorado, pela confiança e amizade.

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente na realização deste trabalho. Se consegui chegar até aqui foi porque vocês acreditaram em mim e caminharam ao meu lado.

MUITO OBRIGADA!

Polyanna dos Santos Negreiros

O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

(José de Alencar)

RESUMO

Eficácia do monoterpeneo α -Terpineol na atividade antidiarreica em roedores

A diarreia é uma desordem gastrointestinal que se caracteriza pela mudança na consistência das fezes com aumento no teor de água, tornando-as líquidas ou pastosas. De acordo com a UNICEF, a diarreia é uma das principais causas de morte infantil, representando em 2016, aproximadamente 8% de todas as mortes em crianças menores de 5 anos. A terapêutica de doenças diarreicas geralmente é centralizada na reposição de fluidos e eletrólitos, mas as taxas de mortalidade ainda são significativas, então a população faz uso de plantas medicinais como alternativa, tornando-as fonte de pesquisa para descoberta de novos tratamentos. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito do monoterpeneo α -Terpineol (α -TPN) na atividade antidiarreica e possíveis mecanismos envolvidos na atividade evidenciada. Inicialmente, a atividade antidiarreica do α -TPN foi avaliada no modelo de diarreia aguda e *enteropooling* induzido por óleo de rícino em camundongos *Swiss*, que foram pré-tratados com α -TPN (6,25; 12,5; 25; 50 mg/kg, v.o.), e depois de 1 h receberam óleo de rícino (10 mL/kg, v.o.). Os animais foram então colocados em gaiolas forradas e observados durante 4 h, ao final do tempo, foi avaliada a severidade da diarreia, peso total de fezes e a medição do volume do conteúdo intestinal (*enteropooling*). Para avaliar o trânsito gastrointestinal, os camundongos receberam óleo de rícino e 1 h depois foram tratados com α -TPN (12,5 mg/kg, v.o.). Após 1 h, os animais receberam 0,20 mL de carvão ativado por via oral, e 20 min depois foram eutanasiados e a distância percorrida pelo carvão no intestino foi mensurada. A participação opióide e/ou antimuscarínica no trânsito gastrointestinal foi também investigada usando naloxona (2 mg/kg, s.c.; antagonista opióide) e betanecol (3 mg/kg, i.p.; agonista muscarínico), respectivamente. Na diarreia inflamatória, os animais foram pré-tratados com α -TPN (12,5 mg/kg, v.o.) e a diarreia foi induzida por PGE₂ (100 μ g/kg, v.o.). Após 30 minutos os animais foram eutanasiados e o volume do conteúdo intestinal foi mensurado. O efeito do α -TPN (12,5 mg/kg, v.o.) na diarreia secretora foi investigado utilizando o modelo de secreção de fluido em alças intestinais isoladas de camundongos vivos tratados com toxina da cólera. O α -TPN foi avaliado quanto à sua capacidade na absorção de fluidos em alças intestinais isoladas e interação com receptores GM1. As doses testadas apresentaram efeito antidiarreico significativo ($p < 0,05$), reduzindo a quantidade total de fezes (55%; 48%; 44%; 24%, respectivamente) e fezes diarreicas, exceto a dose de 50 mg (47%; 66%; 56%; 10%). Todas as doses foram significativas no protocolo de *enteropooling* (46%; 78%; 66%; 41%, respectivamente), sendo que a dose de 12,5 mg/kg do α -TPN exibiu os melhores resultados, sendo adotada como dose padrão para os testes seguintes. O α -TPN reduziu o trânsito gastrointestinal, a partir de mecanismos anticolinérgicos, além de exercer ação significativa no modelo de diarreia induzida por PGE₂ (Inibição de 39%). Foi capaz de reduzir a geração de fluidos e perdas de íons Cl⁻, ao interagir diretamente com os receptores GM1 e a toxina da cólera no modelo de diarreia secretora, além de aumentar a absorção de fluidos no modelo de absorção intestinal em alças isoladas de camundongos. Diante dos resultados apresentados, comprova-se a atividade antidiarreica do α -TPN por meio de redução da motilidade gastrointestinal na diarreia aguda através da ação anticolinérgica, na diarreia induzida por PGE₂ e na diarreia induzida pela toxina da cólera, a partir da interação entre α -TPN-Toxina-GM1, reduzindo assim a perda de fluidos e íons para o lúmen intestinal, tornando-o um forte candidato à fármaco para tratamento de doenças diarreicas.

Palavras-Chave: Monoterpenos, óleo de rícino, prostaglandina E₂, cólera, Receptor GM1.

ABSTRACT

Efficiency of the α -Terpineol monoterpene on antidiarrheic activity in rodents

Diarrhea is a gastrointestinal disorder that stands out in a number of new ideas on the subject, making them liquid or pasty. According to UNICEF, diarrhea is one of the leading causes of child deaths, accounting for approximately 8% of all deaths in children under 5 years of age in 2016. The treatment of diarrheal diseases is usually centralized in the replacement of fluids and electrolytes, but mortality rates are still significant, so the population uses medicinal plants as an alternative, making them the source of research for the discovery of new treatments. Thus, the aim of this study was to investigate the effect of monoterpene α -Terpineol (α -TPN) on antidiarrheal activity and possible mechanisms involved in the evidenced activity. The antidiarrheal activity of α -TPN was evaluated in the model of acute diarrhea and enteropooling induced by castor oil in Swiss mice, which were pretreated with α -TPN (6.25, 12.5, 25, 50 mg/kg, p.o.), and after 1 h they received castor oil (10 mL/kg, p.o.). The animals were then placed in lined cages and observed for 4 h, at the end of the time, the severity of the diarrhea, total weight of feces and the measurement of intestinal contents (enteropooling) were evaluated. To evaluate the gastrointestinal transit, the mice received castor oil and 1 h later were treated with α -TPN (12.5 mg/kg, p.o.). After 1 h, the animals received 0.20 ml of activated charcoal orally, and 20 min later they were euthanized and the distance covered by the coal in the intestine was measured. Opioid and/or antimuscarinic participation in gastrointestinal transit was also investigated using naloxone (2 mg/kg, s.c., opioid antagonist) and bethanechol (3 mg/kg, i.p., muscarinic agonist), respectively. In inflammatory diarrhea, animals were pretreated with α -TPN (12.5 mg/kg, p.o.) and diarrhea was induced by PGE₂ (100 μ g/kg, p.o.). After 30 minutes the animals were euthanized and the volume of the intestinal contents was measured. In addition, the effect of α -TPN (12.5 mg/kg, p.o.) on secretory diarrhea was investigated using the fluid secretion model in intestinal loops isolated from live mice treated with cholera toxin. α -TPN was evaluated for its ability to absorb fluids in isolated intestinal loops and interaction with GM1 receptors. As measured doses, the significant antidiarrheal effect ($p < 0.05$) decreased the total amount of feces (55%, 48%, 44%, 24%, respectively) and diarrheal stools, except for dose of 50 mg (47%, 66%, 56%, 10%). All doses were significant in the enteropooling protocol (46%, 78%, 66%, 41%, respectively), and the 12.5 mg/kg dose of α -TPN exhibited the best results, being adopted as the standard dose for the following tests. α -TPN reduced gastrointestinal transit from anticholinergic mechanisms, in addition to exerting a significant action on the diarrheal model induced by PGE₂ (39% inhibition). It was able to reduce the generation of fluids and losses of Cl⁻ ions by interacting directly with GM1 receptors and cholera toxin in the secretory diarrhea model, in addition to increasing the fluid absorption in the intestinal absorption model in isolated mouse handles. In view of the results presented, the antidiarrheal activity of α -TPN is demonstrated by reduction of gastrointestinal motility in acute diarrhea through anticholinergic action, in PGE₂-induced diarrhea and in cholera toxin-induced diarrhea, from the interaction between α -TPN-Toxin-GM1, thereby reducing the loss of fluids and ions to the intestinal lumen, making it a strong candidate for the drug for the treatment of diarrheal diseases.

Keywords: Monoterpenes, castor oil, prostaglandin E₂, cholera, GM1 receptor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fisiopatologia da diarreia osmótica	24
Figura 2: Mecanismo envolvido no desenvolvimento de diarreia secretora por <i>Vibrio cholerae</i> e <i>Escherichia coli</i>	25
Figura 3: Patogênese de <i>Vibrio cholerae</i> e ação da toxina da cólera.....	27
Figura 4: Esquema de diarreia induzida por Rotavírus.....	28
Figura 5: Causas globais da morte infantil em 2013.....	31
Figura 6: Áreas de risco de adquirir diarreia	32
Figura 7: Síntese dos terpenos.....	40
Figura 8: Estrutura dos mono e sesquiterpenos.....	41
Figura 9: Representação esquemática do protocolo experimental de indução de diarreia por óleo de rícino induzido por óleo de rícino.....	48
Figura 10: Representação esquemática do protocolo experimental de <i>Enteropooling</i>	49
Figura 11: Representação esquemática do protocolo experimental de motilidade gastrointestinal e modulação opioide.....	51
Figura 12: Representação esquemática do protocolo experimental da modulação colinérgica.....	52
Figura 13: Representação esquemática do protocolo experimental de indução de diarreia por PGE ₂ e de acúmulo de fluido intestinal (<i>enteropooling</i>).....	53
Figura 14: Representação esquemática do protocolo experimental de avaliação da secreção de fluido induzido pela toxina da cólera em alças intestinais isoladas de camundongos.....	54
Figura 15: Representação esquemática do protocolo experimental de avaliação da absorção em alças intestinais isoladas de camundongos.....	55
Figura 16: Redução dos escores de severidade diarreica pelo α -TPN em modelo diarreia induzida por óleo de rícino em camundongos.....	59
Figura 17: Efeito do α -TPN sobre o <i>enteropooling</i> induzido por óleo de rícino em camundongos.....	62

Figura 18: Efeito do α -TPN no trânsito intestinal induzido por óleo de rícino em camundongos e modulação do sistema opioide.....	63
Figura 19: Efeito do α -TPN sobre o trânsito intestinal estimulado por betanecol em camundongos.....	64
Figura 20: Efeito do α -TPN sobre o <i>enteropooling</i> induzido por PGE ₂ em camundongos.....	65
Figura 21: Efeito do α -TPN sobre a absorção de fluidos em alças intestinais isoladas em camundongos.....	67
Figura 22. Efeito do α -TPN sobre a ligação da toxina da cólera (CT) ao receptor GM1.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação da diarreia crônica quanto à sua causa.....	23
Tabela 2: Efeito de α -TPN na diarreia induzida por óleo de rícino em camundongos.....	60
Tabela 3: Efeito do α -TPN sobre o <i>enteropooling</i> induzido por óleo de rícino em camundongos.....	61
Tabela 4: Efeito do α -TPN sobre o <i>enteropooling</i> induzido por PGE ₂ em camundongos.....	65

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

α-TPN	Alfa-Terpineol
AC	Adenilil ciclase
ACh	Acetilcolina
ADP	Adenosina Difosfato
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
AMPc	Monosfato cíclico de adenosina
ARF6	Fator 6 de ribosilação ADP
ARFs	Fatores de Ribosilação
Atr	Atropina
Bet	Betanecol
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CRTF	Canal Regulador de Condutância Transmembranar de Fibrose Cística
CT	Toxina da Cólera
CT-A	Subunidade A da toxina da cólera
CT-B	Subunidade B da toxina da cólera
DAG	Diacilglicerol
EP	Receptor de Prostaglandina E ₂
EPM	Erro padrão da média
ER	Reticulo endoplasmático
ERAD	Fatores de degradação do retículo endoplasmático
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
FDA	Food and Drug Administration
Gi	Proteína G inibitória
GM1	Monossialogangliosídeo 1
G_{q/11}	Proteína G envolvida na ativação da fosfolipase C
Gs	Proteína G estimulatória
GTP	Trifostato de Guanosina
HAstV	Astrovírus humano
IP₃	Trisfosfato de inositol

LIN-Bcd	Linalol incorporado no complexo de inclusão de β -ciclodextrina
Lop	Loperamida
LT	Toxina termolábil de <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
M₃	Receptor muscarínico
mM	Milimolar
mOsm	Miliosmolar
Na⁺/K⁺ATPase	Bomba de sódio/potássio ATPase
NKCC	Cotransportador de cloreto, potássio e sódio
NO	Óxido Nítrico
NSP4	Enterotoxina do Rotavírus
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAF	Fator Ativador de Plaquetas
PBS	Solução tampão fosfato-salina
PGE₂	Prostaglandina E ₂
PIP₂	Bisfosfato de fosfatidilinositol
PKA	Proteína Quinase A
PKG	Proteína Quinase C
PLC	Fosfolipase C
SESAPI	Secretaria de Saúde do Estado do Piauí
SGLT1	Co-Transportador de Na ⁺ e glicose
SRO	Solução de reidratação oral
ST	Toxina termoestável de <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
TGI	Trato Gastrointestinal
UNICEF	Fundo das Nações Unidas para Infância
VSL#3	Combinação de <i>Bifidobacterium</i> , <i>Lactobacillus</i> e <i>Streptococcus</i> SP

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 <i>Problematização</i>	18
1.2 <i>Definições e classificação das doenças diarreicas</i>	20
1.2.1 <i>Tempo de Evolução</i>	20
1.2.1.1 <i>Diarreia Aguda/Prolongada</i>	20
1.2.1.2 <i>Diarreia Persistente</i>	21
1.2.1.3 <i>Diarreia Crônica</i>	22
1.2.2 <i>Mecanismos Fisiológicas</i>	23
1.2.2.1 <i>Diarreia Osmótica</i>	23
1.2.2.2 <i>Diarreia Secretora</i>	24
1.2.2.2.1 <i>Diarreia Secretora causada por Vibrio cholerae e Escherichia coli</i>	24
1.2.2.2.2 <i>Diarreia causada por Rotavírus</i>	27
1.2.2.3 <i>Diarreia Exsudativa</i>	29
1.2.2.4 <i>Diarreia Motora</i>	30
1.3 <i>Epidemiologia das Doenças Diarreicas</i>	30
1.4 <i>Tratamentos utilizados contra Doenças Diarreicas</i>	33
1.4.1 <i>Solução de Reidratação Oral</i>	33
1.4.2 <i>Fármacos Opioides</i>	34
1.4.3 <i>Fármacos Anticolinérgicos</i>	35
1.4.4 <i>Antimicrobianos</i>	35
1.4.5 <i>Probióticos</i>	36
1.4.6 <i>Plantas Medicinais</i>	37
1.5 <i>Pesquisa de Plantas Medicinais para o Tratamento da Diarreia</i>	37
1.6 <i>Ações Farmacológicas de Terpenos e Monoterpenos</i>	39
1.7 <i>Monoterpeno α-TPN</i>	41
2 OBJETIVOS	44
2.1 <i>Geral</i>	44
2.2 <i>Específicos</i>	44
3 METODOLOGIA	46

3.1 Drogas e Reagentes.....	46
3.2 Animais	46
3.3 Avaliação da diarreia induzida por óleo de rícino em animais tratados com α -TPN	47
3.4 Acúmulo de fluido intestinal (enteropooling) induzido por óleo de rícino	48
3.5 Avaliação da motilidade gastrintestinal	49
3.6 Enteropooling induzido por PGE ₂	52
3.7 Avaliação da secreção de fluido induzida pela toxina da cólera em alças intestinais isoladas de camundongos tratados com α -TPN.....	53
3.8 Determinação da concentração de íons cloreto no fluido intestinal.....	54
3.9 Avaliação da absorção intestinal em alças intestinais isoladas de camundongos tratados com α -TPN.....	55
3.10 Avaliação da Ligação do α -TPN ao Receptor GM1 (Ensaio GM1-ELISA).....	56
3.11 Dados e Análise Estatística	56
4 RESULTADOS	59
4.1 Escores de Severidade e Efeito do α -TPN sobre a redução da diarreia induzida por óleo de rícino	59
4.2 Redução da geração de fluido intestinal pelo α -TPN na diarreia induzida por óleo de rícino.....	61
4.3 Efeito do α -TPN sobre o trânsito intestinal mediado pelo sistema opioide	62
4.4 Avaliação da participação muscarínica sobre o trânsito gastrintestinal de camundongos	63
4.5 Efeito do α -TPN sobre os parâmetros de diarreia causados por PGE ₂	64
4.6 Efeito inibitório do α -TPN sobre o acúmulo de fluido intestinal gerado pela toxina da cólera em alças intestinais isoladas em camundongos	66
4.7 Efeito do α -TPN sobre a concentração de íons cloreto no lúmen intestinal de alças isoladas em camundongos	66
4.8 Efeito do α -TPN sobre a absorção de fluidos em alças intestinais isoladas em camundongos	66
4.9 Avaliação da interação entre receptor-toxina e α -TPN pelo ensaio ELISA-GM1	68
5 DISCUSSÃO	70
6 CONCLUSÕES	81
7 PERSPECTIVAS	83
REFERÊNCIAS	84

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Problematização

De acordo com a UNICEF (Fundo das Nações Unidas para Infância), a diarreia é uma das principais causas de morte infantil, e que no ano de 2016 representou aproximadamente 8% de todas as mortes em crianças menores de 5 anos, ou seja, mais de 1.300 crianças morreram por dia e aproximadamente 480.000 por ano (UNICEF, 2018). Nos países em desenvolvimento, geralmente a diarreia é resultante de agentes infecciosos, enquanto que em países industrializados, a patologia está especialmente relacionada a alterações anatômicas, funcionais e imunológicas (AUTH; VORA; KOKAI, 2016).

A diarreia é uma desordem gastrointestinal que se caracteriza pela mudança na consistência das fezes com aumento no teor de água, tornando-as líquidas ou pastosas, e alterações na frequência de evacuações, podendo se manifestar de modo agudo ou crônico (SMIEJA; GOLDFARB, 2016).

Normalmente a absorção e secreção de água no lúmen intestinal ocorrem de forma simultânea, sendo que a absorção é quantitativamente mais elevada e quando esta, é incompleta, torna-se um dos processos fundamentais no desenvolvimento de doenças diarreicas. Se houver uma redução na absorção ou um aumento na secreção ocorre um acúmulo excessivo de água adicional no lúmen, provocando diminuição da consistência das fezes e assim, ocasionando a diarreia (SWEETSER, 2012).

Na prática médica a distinção entre diarreia aguda e crônica se faz principalmente pela duração dos sintomas, enquanto a primeira apresenta sintomatologia rápida, a diarreia crônica é definida pela sua duração prolongada de mais de quatro semanas. A diarreia crônica possui um diagnóstico diferencial mais amplo e para o diagnóstico, deve-se avaliar a história clínica do paciente, exame físico completo, exames laboratoriais e testes funcionais, tais como a colonoscopia (BARES et al., 2017; SCHILLER; PARDI; SELLIN, 2017).

Diversos patógenos entéricos, entre vírus, protozoários e bactérias podem estar envolvidos no desequilíbrio da secreção de água e eletrólitos, desencadeando doenças diarreicas. Este envolvimento ocorre por diferentes mecanismos, como a

produção de enterotoxinas, encurtamento das vilosidades, diminuindo assim, a área de superfície para a absorção de nutrientes e até mesmo promovendo a destruição dos enterócitos. Alguns patógenos invasivos, como *Clostridium difficile* e *Shigella* são responsáveis pelo desenvolvimento de diarreia inflamatória caracterizada por febre e presença de polimorfonucleares nas fezes (HODGES; GILL, 2010; MUANGNIL et al., 2018).

A terapêutica de doenças diarreicas geralmente é centralizada na reposição de fluidos e eletrólitos utilizando soluções de reidratação oral, mas mesmo sendo uma terapia bem sucedida, as taxas de mortalidade e a morbidade ainda são significativas (THIAGARAJAH et al., 2014). Além das terapias orais, o uso de plantas medicinais ou de compostos oriundos delas como forma de tratamento se mostra de grande relevância, como por exemplo, *Mentha piperita* L. - Hortelã-pimenta (LOGAN; BEAULNE, 2002), *Psidium guajava* L. – Goiabeira (BIRDI et al., 2010), *Laurus nobilis* L. – Loureiro (QNAIS et al., 2012), *Citrus limon* L. – Limão (ADENIYI et al., 2017). A biodiversidade no Brasil tem contribuído para a descoberta de numerosas moléculas biologicamente ativas e tem estimulado grande interesse de pesquisas, sendo fundamentada em informações de várias gerações, envolvendo o estudo com óleos essenciais, extratos, frações ou substâncias isoladas, que vem aumentando significativamente a possibilidade de desenvolvimento de fármacos fitoterápicos (AGRA et al., 2008; SILVA et al., 2018).

O α -Terpineol (α -TPN) é um álcool monoterpênico volátil, e pesquisas tem demonstrado seu potencial farmacológico em reduzir a hipernociceção mecânica e a resposta inflamatória (OLIVEIRA et al., 2012), na atividade anticonvulsivante (SOUSA; QUINTANS-JUNIOR; ALMEIDA, 2007), efeito cardiovascular (SABINO et al., 2013), efeito sobre lesões gástricas (FERNANDES, 2016) e indução de retenção gástrica provavelmente envolvendo sinalização colinérgica (SILVA et al., 2016). Este monoterpeneo α -TPN está presente no óleo essencial de várias plantas medicinais, como da *Punica granatum* L. (romã) (QNAIS et al., 2007), *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim) (PACHÚ, 2007), *Illicium verum* (anis-estrelado) (FONSECA et al., 2012), *Psidium guajava* L. (goiabeira) (TROTТА et al., 2012) que tem uso popular para diarreia, evidenciando que o α -TPN pode ser um possível fármaco antidiarreico.

1.2 Definições e Classificação das Doenças Diarreicas

A doença diarreica é caracterizada pelo surgimento de fezes líquidas com ou sem vômitos, que podem estar associadas com febre e cólicas abdominais (KOTLOFF, 2017). Clinicamente, a diarreia é definida pelo aumento no peso das fezes, excedendo 200 gramas/dia, mas é uma medida pouco significativa porque este valor pode variar de acordo com a dieta, além de que o paciente pode não ser capaz de estimar o peso em gramas. A diarreia comumente é subjetiva e diferenciada de um paciente para o outro, sendo que as características mais comuns incluem aumento da frequência das evacuações e mudanças na consistência das fezes para líquidas ou pastosas (TRINH; PRABHAKAR, 2007).

A diarreia pode ter diversas etiologias como: microbiana (bactérias, vírus, protozoários), uso de medicamentos, alimentos contaminados, doenças endócrinas, síndrome do intestino irritável, e é classificada de acordo com o período de duração: prolongada/aguda (1-13 dias), persistente (14 dias ou mais) e crônica (mais de 30 dias), ou de acordo com os mecanismos fisiológicos: osmótica, secretória, exsudativa e motora, em que a maioria das etiologias tem uma fisiopatologia complexa envolvendo um ou mais destes mecanismos (DANTAS, 2004; PATEL; THILLAINAYAGAM, 2009; VELÁZQUEZ et al., 2012; BHUTTA; SYED, 2016).

1.2.1 Tempo de Evolução

1.2.1.1 Diarreia Aguda/Prolongada (DDA)

A diarreia aguda é considerada um episódio diarreico com início rápido, duração menor que 14 dias, auto-limitada, aumento do volume e frequência de fezes e perda de nutrientes, como água e eletrólitos. Geralmente a sua etiologia é infecciosa, e as principais complicações podem ser devido distúrbios hidroeletrólíticos e déficits nutricionais. Em relação à gravidade, a DDA é classificada em leve, moderada ou grave: leve quando não são observados sinais de desidratação; moderada quando há sinais leves ou moderados de desidratação e a reidratação pode ser realizada por via oral; e ainda quando resulta em desidratação mais intensa com ou sem distúrbios eletrolíticos, e requer terapia intravenosa. (BRANDT; ANTUNES; SILVA, 2015).

As principais causas deste tipo de diarreia podem ser infecções por vírus (rotavírus, novovírus, astrovírus, adenovírus e calcivírus), bacterianos (como alguns patótipos de *Escherichia coli*, *Campylobacter* spp., *Salmonella enteritidis*, *Shigella* spp., *Vibrio cholerae* e *Clostridium perfringens*), intoxicação alimentar/toxinas (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus* spp.), medicamentos (antibióticos, antiácidos, antagonistas H₂), ingestão recente de alimentos não absorvíveis (frutose, manitol, sorbitol), isquemia intestinal (DANTAS, 2004; PATEL; THILLAINAYAGAM, 2009; DRANCOURT, 2017; HOLMGREN; LUNDGREN, 2018).

A DDA pode apresentar-se como diarreia do viajante quando inicia-se durante ou logo após viajar para países de baixa renda ou em desenvolvimento. Geralmente é associado a náuseas e vômitos, e mais raramente à dor abdominal, febre e sangue ou muco nas fezes. Alguns fatores relacionados podem predispor a patologia, como idade, estado imune do hospedeiro ou uso de medicamentos como inibidores da bomba de prótons, já que reduzem o ácido clorídrico no estômago, permitindo que organismos se proliferem e passem em maior número para o intestino (HEARN; DOHERTY, 2014).

1.2.1.2 Diarreia Persistente (DP)

A diarreia persistente é caracterizada como uma patologia que se inicia na forma aguda, mas persiste por mais de 14 dias e representa 30-50% dos casos de morte provocados por diarreia em países em desenvolvimento. Ocorre predominantemente em crianças menores de três anos, e a desnutrição e imunossupressão são fatores de risco para o desenvolvimento da doença. Os principais agentes envolvidos na diarreia persistente são *Escherichia coli* enteropatogênica, *Escherichia coli* enteroagregativa, *Giardia* e *Cryptosporidium* (GRIMWOOD; FORBES, 2009).

Este tipo de diarreia pode resultar de múltiplas infecções consecutivas, uma infecção não resolvida, má absorção secundária (principalmente lactose) ou a síndrome de pós-gastroenterite em que os pacientes apresentam má absorção ou sensibilização prolongada aos antígenos alimentares após um episódio diarreico agudo ou subagudo. Além das causas infecciosas, a diarreia persistente pode ser

provocada por doença celíaca, intolerância ao leite de vaca, colite alérgica, intolerância a vários carboidratos. Apesar da predominância em crianças, esta diarreia persistente pode ocorrer em adultos, especialmente pacientes com AIDS (OCHOA; SALAZAR-LINDO; CLEARY, 2004).

1.2.1.3 Diarreia Crônica

A diarreia crônica é definida pela presença de fezes pastosas ou líquidas mais de três vezes ao dia durante um período de mais de quatro semanas. Pode também ser medida pelo volume ou peso, sendo considerada diarreia, o excedente de 200g de fezes aquosas a cada 24 horas. Atualmente, estima-se que mais de 5% da população tenha diarreia crônica e quase 40% desses pacientes tenham mais de 60 anos de idade (FERNÁNDEZ-BANÑARES et al., 2016).

As etiologias para diarreia crônica são amplas, com implicações clínicas variáveis, então uma maneira para categorizar a diarreia crônica é fundamentada na fisiopatologia (Tabela 1). Assim, a diarreia crônica pode ser classificada como osmótica, secretora, inflamatória e diarreia por má absorção. Para conseguir o diagnóstico da doença diarreica crônica podem-se realizar testes de triagem de sangue e fezes ou testes mais complexos, como diagnóstico por imagem e avaliação endoscópica e histológica (RAMAN, 2017).

A diarreia crônica em crianças mostra uma etiologia relacionada à idade. Em lactentes, pode estar relacionada a infecções intestinais persistentes e intolerância a nutrientes específicos, como a proteína do leite de vaca. Nos recém-nascidos, a diarreia congênita é uma síndrome rara, mas bastante grave. Em crianças e adolescentes, a doença celíaca é uma das principais causas de diarreia (GUARINO; VECCHIO; CANANI, 2012).

Tabela 1: Classificação da diarreia crônica quanto a sua causa

TIPOS DE DIARREIA	CAUSAS
Osmótica	Laxantes osmóticos (Mg^{+2} , PO_4^{-3} , SO_4^{-2}); Frutose (frutas, refrigerantes)

Secretora	Enterotoxinas bacterianas; Distúrbios endócrinos; Diarreia congênita por cloreto; Câncer colorretal; Linfoma de intestino delgado
Inflamatória	<i>Doença inflamatória do intestino:</i> Colite ulcerativa; Doença de Crohn <i>Doenças Infecciosas:</i> Bactérias - <i>Shigella, Salmonella, Campylobacter, Yersinia, Clostridioides difficile;</i>
Esteatorreia	<i>Causas Entéricas:</i> Doença Celíaca, Doença de Whipple; Síndrome do Intestino Curto; <i>Síndromes de má digestão:</i> Insuficiência pancreática exócrina; Baixos níveis de ácido biliar no lúmen intestinal.

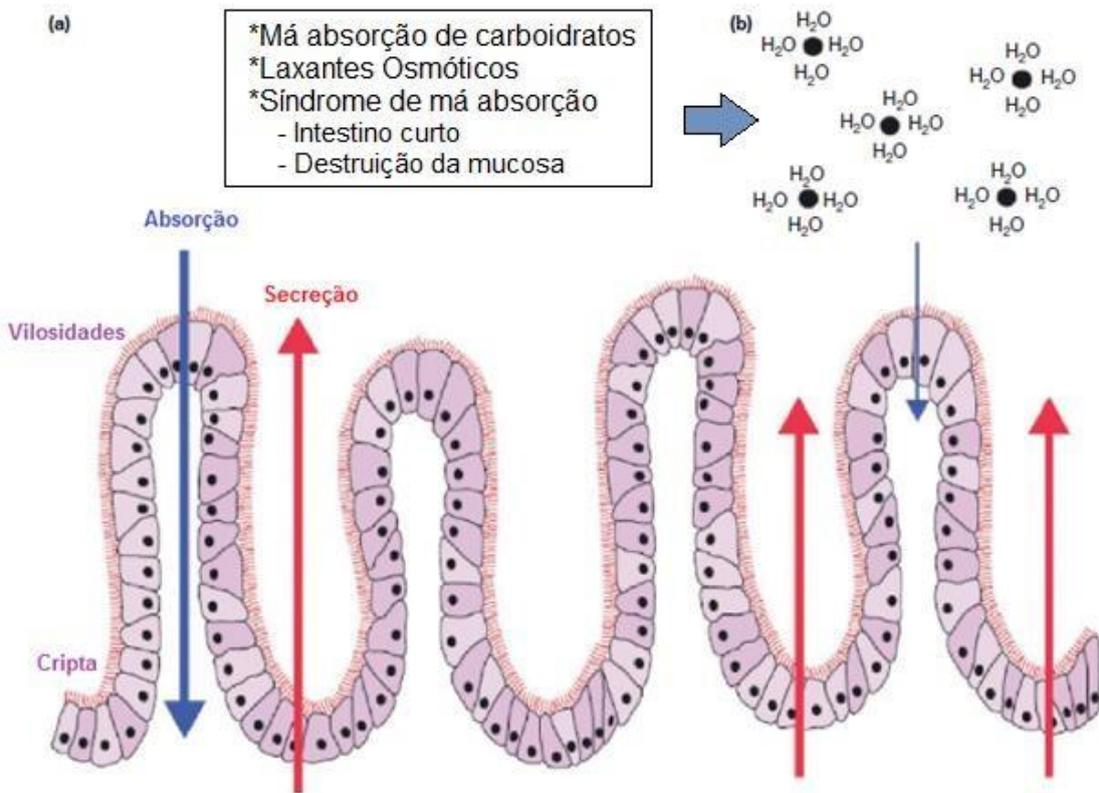
Adaptado de FERNÁNDEZ-BANÁRES et al. (2016)

1.2.2 Mecanismos Fisiológicos

1.2.2.1 Diarreia Osmótica

A diarreia osmótica ocorre quando um número excessivo de partículas osmoticamente ativas encontra-se no lúmen intestinal e assim, mais fluido move-se passivamente para o lúmen pelo gradiente osmótico, desencadeando um aumento da osmalalidade luminal, que pode exceder a capacidade de absorção do intestino. Isso pode ocorrer devido à ingestão de solutos que não são absorvidos, como laxantes osmóticos; má absorção de solutos específicos, como deficiência de lactase congênita ou adquirida; insuficiência pancreática; danos na área de absorção da mucosa resultando em menos absorção de fluido, como gastroenterite aguda, e doença celíaca; distúrbios de motilidade, como os observados na síndrome do intestino irritável que resulta em redução do contato com a luz intestinal e, conseqüentemente, maior concentração de solutos no interior do lúmen (Figura 1) (SHILLER, 2012).

Figura 1: Fisiopatologia da diarreia osmótica



Legenda: (a) Representa o ambiente luminal normal e (b) representa os efeitos de agentes osmóticos, como carboidratos não absorvidos. Fonte: Adaptado de BHUTTA; SYED (2016).

1.2.2.2 Diarreia Secretora

A diarreia secretora é provocada pela superestimulação da capacidade de secreção de água e eletrólitos no lúmen intestinal, sendo o efeito final o aumento da secreção de Cl^- e diminuição da absorção intestinal de Na^+ e Cl^- (MOON et al., 2015; THIAGARAJAH et al., 2015). As principais causas desse tipo de diarreia são bactérias produtoras enterotoxina como o *Vibrio cholerae* e *Escherichia coli* enterotóxica, rotavírus, e as bactérias enteroinvasivas como *Shigella* e *Salmonella* (WALKER et al., 2013).

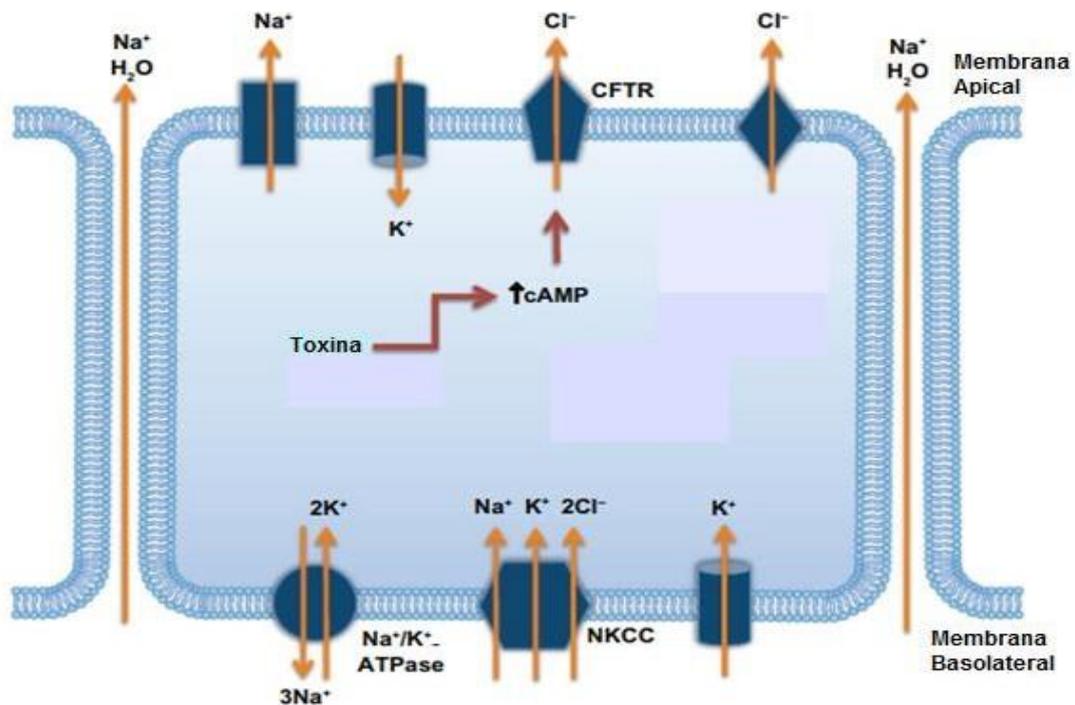
1.2.2.2.1 Diarreia Secretora causada por *Vibrio cholerae* e *Escherichia coli*

Estirpes de *Escherichia coli* enterotoxigênica e cepas O1 ou O139 de *Vibrio cholerae* são as principais causas de diarreia secretora devido a produção de enterotoxinas por estas bactérias que causam aumentos acentuados nas secreções

entéricas e motilidade intestinal, resultando em fezes frequentes, volumosas e aquosas, acompanhadas de náuseas e vômitos, que muitas vezes precedem a diarreia e em casos graves, pode ocorrer desidratação profunda (McCLARREN; LYNCH; NYAYAPATI, 2011; THIAGARAJAH; VERKMAN, 2013; LÓPEZ-HERNÁNDEZ et al., 2015).

Estas toxinas causam um aumento nos níveis de AMPc nos enterócitos situados nas criptas, provocando a abertura dos canais reguladores de condutância transmembranar de fibrose cística (CRTF) na membrana luminal e isso promove o movimento de íons cloreto para o lúmen, causando assim um movimento secundário de íons sódio para manter a neutralidade elétrica. Então, a água segue o gradiente osmótico criado pelo sódio e cloreto, causando um forte aumento no extravasamento de líquido para o lúmen intestinal (Figura 2), provocando a diarreia secretória (WHYTE; JENKINS, 2012; PATEL et al., 2013).

Figura 2: Mecanismo envolvido no desenvolvimento de diarreia secretora por *Vibrio cholerae* e *Escherichia col*

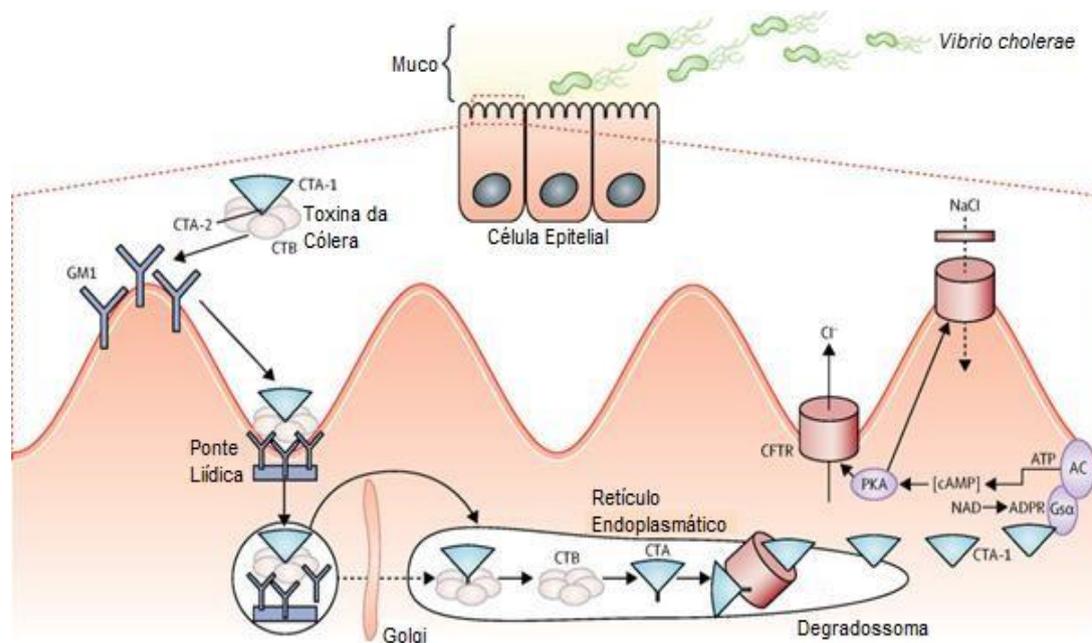


Legenda: cAMP: adenosina monofosfato cíclico; CFTR: canal de cloreto; Cl^- : cloreto; H_2O : água; K^+ : potássio; Na^+ : sódio; NKCC, cotransportador de cloreto, potássio e sódio; Na^+/K^+ ATPase: Bomba de sódio/potássio ATPase. Fonte: Adaptado de PATEL, et al. (2013).

Vibrio cholerae é uma bactéria Gram-negativa que produz a toxina da cólera (CT) composta por duas subunidades, CT-A e CT-B. A subunidade CT-A é composta por dois polipeptídeos, CT-A1 e CT-A2, responsáveis pela atividade tóxica, enquanto a subunidade CT-B apresenta uma estrutura de cinco monômeros não tóxicos, responsável pela ligação específica da toxina aos receptores gangliosídeos GM1 presente nas superfícies das células intestinais (LIM et al., 2018; NAVOLOTSKAYA et al., 2018). Após a ligação ao GM1, a CT é endocitada pela célula e ocorre a internalização do complexo toxina-receptor através da ação de caveolina, clatrina ou via endocítica ARF6 (fator de ribosilação de ADP) que medeiam o transporte até o complexo de Golgi. Existe uma afinidade do complexo CT-GM1 com o citoesqueleto de actina que tem papel no transporte de CT do complexo de Golgi ao retículo endoplasmático (ER). Depois que CT atinge o ER, é envolvido um processo celular de reciclagem natural que normalmente recupera as proteínas dobradas do ER para a sua degradação no citosol. No entanto, CT-A1 aparentemente escapa à proteólise pelos fatores de degradação do retículo endoplasmático (ERAD), presumivelmente devido ao seu baixo teor de lisina, que é o alvo da ubiquitinação. No entanto, o retículo endoplasmático reconhece o complexo proteico e induz a síntese de uma enzima chamada dissulfeto isomerase, que atua clivando as pontes dissulfeto de proteínas para que elas possam ser dobradas corretamente com o auxílio de chaperonas e é nesse momento que a subunidade A da toxina se desconecta do complexo toxina-receptor (Figura 3). Assim ocorre a entrada de CTA1, que catalisa a ribosilação de ADP do componente trimérico da proteína Gs, ativando Adenil ciclase e consequentemente ocorre um aumento de AMPc, que promove a abertura dos canais de cloreto e promove a diarreia profusa, como foi explicado anteriormente (SÁNCHEZ; HOLMGREN, 2011).

Escherichia coli enterotoxigênica (ETEC) também são bactérias Gram-negativas que causam diarreia profusa através de adesinas fimbriais para aderirem a enterócitos ao longo do intestino delgado proximal e então liberam dois tipos de enterotoxinas: Toxina termolábil (LT) e Toxina termoestável (ST) que promovem diarreia pelo mesmo mecanismo que *Vibrio cholerae*. Sua transmissão é fecal-oral, sendo que este micro-organismo é mais frequente em áreas com práticas de higiene precárias e com acesso limitado ao saneamento e à água potável (WIERZBA; BOURGIS, 2017; ZHANG et al., 2018).

Figura 3: Patogênese de *Vibrio cholerae* e ação da toxina da cólera



Legenda: GM1: receptores gangliosídeo; CTA₁ e CTA₂: subunidades da toxina da cólera responsáveis pela atividade tóxica; CTB: subunidade responsável pela ligação específica da toxina aos receptores gangliosídeos GM1; AC: adenilil ciclase; cAMP: adenosina monofosfato cíclico; CFTR: canal de cloreto; Cl⁻: cloreto; NaCl: cloreto de sódio; Fonte: Adaptado de CLEMENS, et al. (2017).

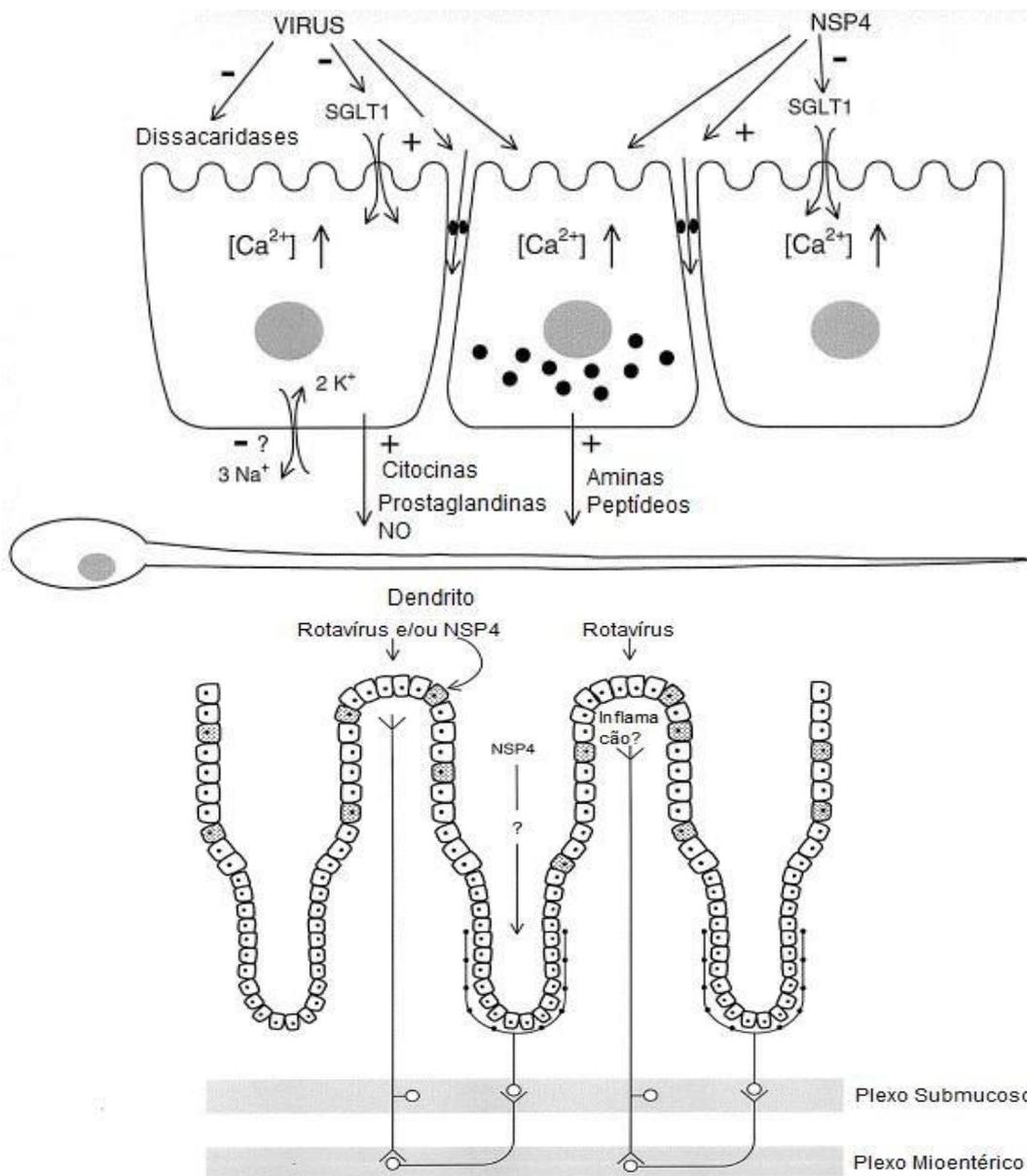
1.2.2.2.2 Diarreia Secretora causada por Rotavírus

É necessário ressaltar que pode haver uma combinação de diarreia osmótica e secretora, como no caso de rotavírus onde há secreção mediada por enterotoxina juntamente com diarreia osmótica provocada pelo dano ao enterócito (BHUTTA; SYED, 2016). O rotavírus é o principal agente causador da diarreia aguda infantil e assim encontra-se na quarta posição dentre as causas mais comuns de mortalidade nesta população (GBD, 2015).

Estes vírus infectam enterócitos nas vilosidades do intestino delgado, resultando em morte celular, e assim é liberada uma nova progênie de rotavírus e proteínas virais, dentre elas a enterotoxina NSP4, que promove a inibição do transporte de fluidos e eletrólitos, diminuindo SGLT1 (transportador de glicose) e assim impede a produção e ação das dissacaridases. Em conjunto, esses eventos reduzem as taxas de absorção de fluidos, eletrólitos e glicose. Além disso, a concentração de cálcio intracelular é aumentada no epitélio intestinal em resposta ao rotavírus e sua enterotoxina NSP4 e isto pode promover a liberação de aminas e

peptídeos das células endócrinas intestinais que ativam células dendríticas neuronais e, portanto, estimulam os reflexos secretores no sistema nervoso entérico pelo aumento de fluxo de água e eletrólito no lúmen intestinal. A NSP4 pode também se difundir nas criptas para influenciar diretamente o epitélio secretor do intestino. Os mediadores inflamatórios, se presentes, também podem estimular os reflexos nervosos (Figura 4). Após vários ciclos virais, a extensiva lise celular provoca o encurtamento das microvilosidades e há uma redução da superfície de absorção do epitélio intestinal, resultando em um componente osmótico que sobrepõe ao secretor (RUIZ; COHEN; MICHELANGELI, 2000; LUNDGREN; SVENSSON, 2001).

Figura 4: Esquema de diarreia induzida por Rotavírus



Legenda: SGLT1: transportador de glicose; NO: óxido nítrico; NSP4: enterotoxina do rotavírus. Fonte: Adaptado de LUNDGREN; SVENSSON (2001).

1.2.2.3 Diarreia Exsudativa

Este tipo de diarreia ocorre quando a barreira epitelial intestinal é comprometida pela perda de células epiteliais ou rompimento de suas junções, promovendo a exsudação de água, eletrólitos, proteínas do soro, sangue, muco ou pus, a partir de áreas inflamadas para o lúmen intestinal, aumentando o volume fecal, e assim, desencadenando a diarreia. Nesse grupo, estão incluídas as doenças inflamatórias intestinais (Colite ulcerativa, Doença de Crohn), neoplasias intestinais, infecções por *Escherichia coli.*, *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Clostridioides difficile* e *Entamoeba* (DANTAS, 2004; VELÁZQUEZ et al., 2012).

A *Salmonella*, *Shigella* e o *Campylobacter* invadem a mucosa intestinal e provocam uma lesão causando ulceração, inflamação e hemorragia (GALE; WILSON 2016). O *Clostridioides difficile* produz uma enterotoxina, toxina A, e uma citotoxina, toxina B, que causam diarreia e colite (ROCHA et al., 1998). Doenças inflamatórias intestinais, como colite, são caracterizadas por um processo inflamatório, na qual ocorre migração de leucócitos e produção de citocinas pró- inflamatórias como TNF- α e IL-1 β , provocando diarreia (CUNHA, 2012).

A diarreia infecciosa aguda também pode ser causada por vírus, como o Norovírus e Rotavírus, causando redução da absorção de fluidos e eletrólitos. (GUERRANT et al., 2001). O norovírus tem prevalência estimada em 12% em crianças menores de cinco anos de idade hospitalizadas por diarreia grave (DRANCOURT, 2017). São membros da família Caliciviridae e suas cepas podem ser divididas em cinco grupos (GI, GII, GIII, GIV e GV), sendo os grupos GI, GII e GIV os responsáveis por infectar humanos (LOGAN; O'LEARY; O'SULLIVAN, 2007). A doença pode provocar vômitos, náuseas diarreia e febre, além de distúrbios eletrolíticos, lesão renal aguda, arritmia e morte em casos de pacientes idosos. O norovírus tem transmissão via oral-fecal e por meio da ingestão de água ou alimentos contaminados (MAWATARI; KATO, 2014; WHITE; RAJAGOPALAN; YOSHIKAWA, 2016).

1.2.2.4 Diarreia Motora

Este tipo de diarreia é provocada por perturbações da motilidade intestinal, como o trânsito acelerado, causando inadequada mistura do alimento com as enzimas digestivas, e o pouco contato com a superfície absorptiva, por ressecção intestinal ou fístulas enteroentéricas. Além disso, doença celíaca, doenças inflamatórias do intestino, síndrome do intestino irritável, resultam em aumento da motilidade, promovendo diarreia (DANTAS, 2004).

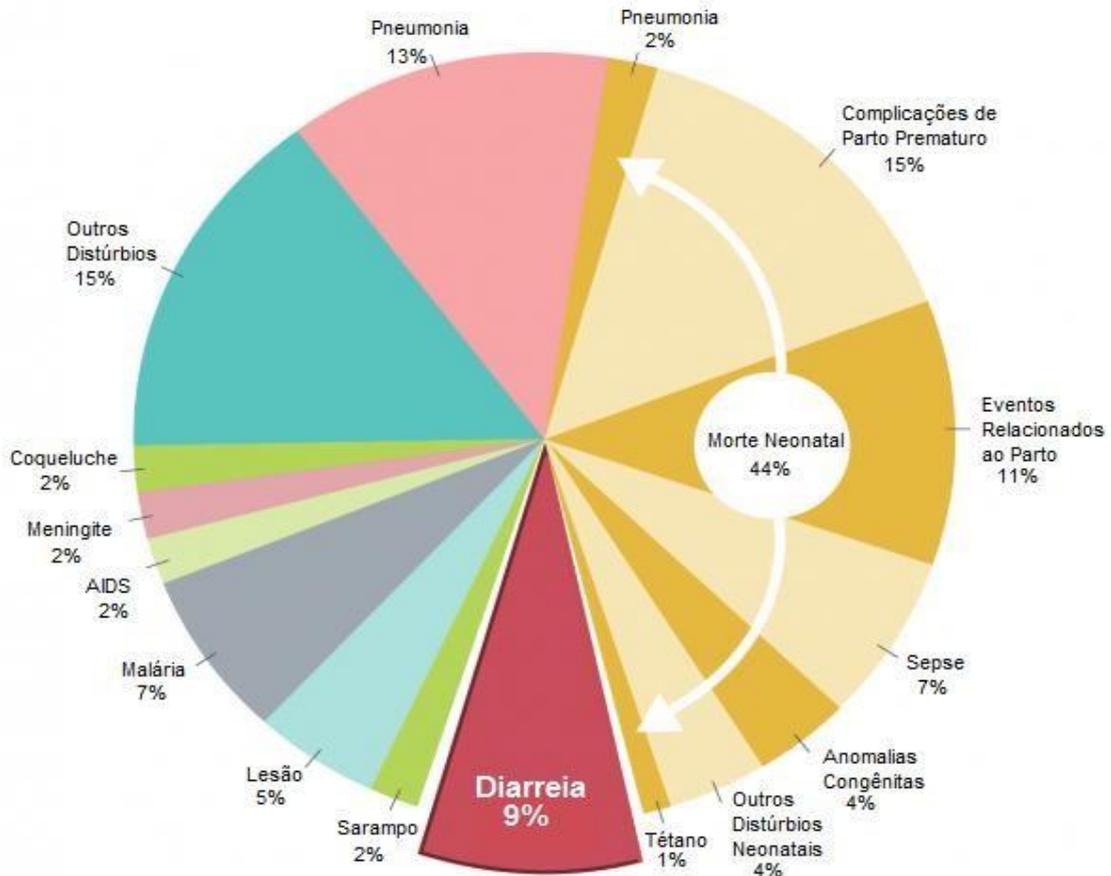
1.3 Epidemiologia das Doenças Diarreicas

A diarreia encontra-se entre as cinco principais causas de morte em países de baixa e média renda, com uma estimativa de 4,5 bilhões de episódios anualmente e dentre estes, 1,7 bilhão ocorrem em crianças menores de cinco anos de idade e ocasiona cerca de 525.000 óbitos nesta população (WHO, 2017).

Os principais fatores de risco para o surgimento de doenças diarreicas em países em desenvolvimento é o acesso precário a água potável, uma higiene adequada e saneamento básico (KOTLOFF, 2017). A defecação em locais abertos leva à contaminação hídrica devido ao transporte de patógenos de material fecal humano e animal para fontes de água potável em períodos chuvosos (KUMAR et al., 2017).

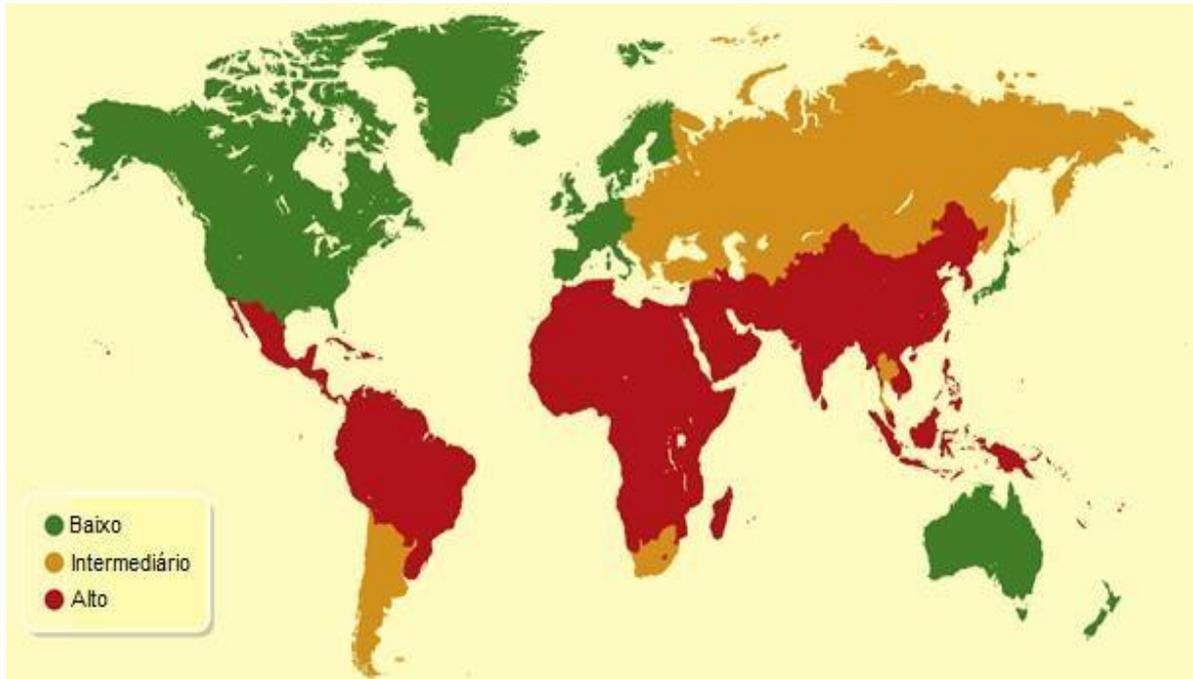
No ano de 2013, foi mensurado 6,3 milhões de mortes de crianças na faixa etária de até cinco anos, e dentre estes, 51,8% morreram por causas infecciosas, sendo que a diarreia encontra-se na segunda posição entre as causas mais comuns, ficando abaixo apenas das infecções agudas do trato respiratório (Figura 5). Nos países em desenvolvimento, as causas de doenças diarreicas são principalmente infecciosas, incluindo bactérias produtoras de enterotoxinas, como *Vibrio cholerae* e *Escherichia coli*; vírus, como o rotavírus e bactérias enteroinvasivas, como *Shigella* e *Salmonella* (LIU et al., 2015)

Figura 5: Causas globais da morte infantil em 2013



FONTE: LIU et al., 2015 (Adaptado)

Analisando os locais de risco de diarreia, estas áreas podem ser consideradas de baixo risco em que a incidência é menor ou igual a 8% que incluem o centro e norte da Europa, Estados Unidos, Canadá, Japão, Austrália, e Nova Zelândia regiões com um risco intermediário de mais de 8% a 20% incluindo o sul e leste da Europa, Rússia, China, Israel, Caribe e África do Sul, e áreas com maior risco, onde as taxas de diarreia do viajante estão entre 20% e 90% e incluem países do Oriente Médio, sul da Ásia, América Central e do Sul e África (Figura 6) (KOLLARITSCH; PAULKE-KORINEK; WIEDERMANN, 2012).

Figura 6: Áreas de risco de adquirir diarreia

Legenda: Baixo: Regiões de baixo risco; Intermediário: Risco intermediário; Alto: Elevado risco de adquirir diarreia do viajante. Fonte: Adaptado de HEARN; DOHERTY (2014).

No Brasil, os indicadores de mortalidade de 2011 mostraram 756 óbitos por doença diarreica aguda entre crianças menores que cinco anos, sendo 354 (46,82%) destes na região Nordeste, seguido pela região Norte que apresentou 165 óbitos (21,82%). O Piauí apresentou 20 casos, sendo o terceiro estado do Nordeste em maior proporção de mortes, ficando atrás apenas de Pernambuco e Alagoas, mas a maioria dos casos não encontram-se notificados (BRASIL, 2012). A Secretaria de Saúde do Estado do Piauí (Sesapi) notificou cerca de 100 mil casos de diarreia no ano de 2013 e destes 126 óbitos foram registrados em todo o estado (SESAPI, 2018).

De acordo com a UNICEF, no ano de 2016 a diarreia representou aproximadamente 8% de todas as mortes em crianças menores de 5 anos, sendo mensurado 502.806 mortes mundialmente e 1.122 no Brasil nesta população (UNICEF, 2018).

1.4 Tratamentos utilizados contra as Doenças Diarreicas

Para realização do tratamento da diarreia, é necessário o histórico completo do paciente e exames para avaliação clínica da desidratação e da etiologia da patologia para definir a terapêutica inicial de uma doença diarreica (GALE; WILSON, 2016).

Embora continue sendo uma das principais causas de mortalidade em crianças menores de cinco anos, nas últimas décadas houve um declínio na taxa de mortalidade por diarreia aguda nos países em desenvolvimento devido principalmente à implantação da solução de reidratação oral (SRO) da OMS - Organização Mundial da Saúde (SUH; HAHN; CHO, 2010). O principal suporte do tratamento sintomático de diarreia infecciosa aguda, particularmente em crianças pequenas com risco de desidratação, é proporcionar reidratação (FAURE, 2013).

1.4.1 Solução de Reidratação Oral

As primeiras terapias de SRO recomendadas continham 90 mM de sódio, 111 mM de glicose e osmolaridade de 311 mOsm, o que diminuiu mortalidade causada por diarreia aguda, devido ao aumento da hidratação dos pacientes, no entanto, não reduziu o volume fecal ou a duração da diarreia. Isso levou a várias modificações de suas composições e ao desenvolvimento de novas soluções. Então houve uma redução da osmolaridade da SRO (245 mOsm), do sódio (75 mM) e de glicose (75 mM), promovendo assim nestas proporções, o aumento da absorção de sódio e consequentemente de água, melhorando o quadro do paciente (LI; VAZIRI, 2012).

A dosagem prescrita de solução de reidratação oral depende do grau de desidratação. Em casos de desidratação leve (3 a 5% de perda de peso corporal), a dosagem é de 50 mL/kg, sendo que a dosagem deve ser aumentada para 100 mL/kg em pacientes com desidratação moderada (6 a 9% de perda de peso corporal). Durante a desidratação severa ($\geq 10\%$ de peso corporal), os fluídos intravenosos devem ser inicialmente infundidos, seguidos por SRO a 100 mL/kg quando o paciente é consegue realizar a ingestão oral. Esta terapia não é capaz de promover a cura, mas auxilia na recuperação do paciente, exceto quando as perdas são muito severas ou há vômitos profundos associados. Embora a terapia seja recomendada para todas as faixas etárias e para diarreia de qualquer etiologia,

algumas restrições se aplicam ao seu uso, pois apesar da raridade, SRO pode provocar hiponatremia sintomática (ATIA; BUCHMAN, 2009). Além disso, a sua administração é contraindicada em crianças em choque hemodinâmico porque os reflexos de proteção das vias aéreas podem ser prejudicados (KING et al., 2003).

1.4.2 Fármacos Opioides

Medicamentos opioides foram usados há vários séculos para atividade antidiarreica e ainda são considerados como tratamento mais eficaz e não específico para a diarreia (LI; VAZIRI, 2012). Dentre esta classe de fármacos, a loperamida é a uma medicação antidiarreica mais utilizada e seu efeito farmacológico é alcançado predominantemente pela ligação aos receptores μ opioides acoplados a proteína Gi no plexo mioentérico, inibindo a liberação de acetilcolina e prostaglandinas, reduzindo assim, o peristaltismo e a secreção de líquidos, o que resulta em maior tempo de trânsito gastrointestinal e aumento da absorção de fluidos e eletrólitos. Além disso, pode antagonizar os canais de cálcio, o que pode resultar em motilidade gastrointestinal reduzida (GODEL, 2003; MILLER et al., 2017).

A loperamida apresenta uma baixa absorção oral e é incapaz de atravessar a barreira hematoencefálica em doses apropriadas (exceto em crianças menores de dois anos), deste modo possui poucos efeitos no sistema nervoso central, mas não apresentam atividade analgésica significativa e assim não é capaz de diminuir a dor associada a alguns quadros diarreicos. O uso crônico de loperamida pode inibir a motilidade intestinal e prolongar o tempo de trânsito, causando megacolon. Em casos em que a diarreia é causada por infecção por bactérias produtoras de enterotoxinas, não deve ser utilizada terapia antidiarreica, pois a diarreia pode ser um mecanismo protetor e não deve ser inibida. Alguns pacientes podem sofrer sonolência ou tonturas ao usar loperamida, portanto todos os pacientes tem que ser informados sobre o cuidado que devem ter ao dirigir ou operar máquinas após o uso do mesmo (BAKER, 2007).

1.4.3 Fármacos Anticolinérgicos

Anticolinérgicos são outro grupo de fármacos que atuam reduzindo a motilidade e a secreção, a partir do bloqueio da ligação do neurotransmissor (Acetilcolina - ACh) ao receptor muscarínico do tipo M_3 acoplado a proteína Gq. Os fármacos com propriedades anticolinérgicas/antimuscarínicas são utilizados para aliviar os sintomas de diarreia e dor abdominal, e esta classe inclui pirenzepina, dicitlomina e destaca-se a escopolamina. Esses agentes podem atuar em outros órgãos do corpo através de receptores muscarínicos, resultando em efeitos adversos como boca seca, taquicardia e visão prejudicada (LEE, 2015).

Normalmente, quando ocorre a ligação de ACh ao receptor M_3 , há o desmembramento das subunidades α e $\beta\gamma$ da proteína Gq, que ativam uma fosfodiesterase de membrana, a Fosfolipase C (PLC), que tem como função clivar os fosfolípidios de membrana para formar dois mensageiros: Bisfosfato de Fosfatidilinositol (PIP_2) e Diacilglicerol (DAG). A partir de então, a PLC promove a conversão do PIP_2 em Trisfosfato de Inositol (IP_3), na qual este se liga e ativa o receptor de IP_3 existente na membrana do retículo sarcoplasmático, provocando a abertura de canais de cálcio, que resulta em uma rápida liberação de Ca^{2+} das reservas intracelulares para o sarcoplasma, aumentando a concentração de Ca^{2+} , que resulta na ativação do canal operado pelo receptor da rianodina, no retículo sarcoplasmático, promovendo um aumento progressivo da concentração de Ca^{2+} na célula muscular e resultando na contração da célula muscular lisa. O DAG, por possuir uma estrutura hidrofóbica, permanece associado à membrana plasmática, e ativa a Proteína quinase C (PKG), uma enzima ligada à membrana plasmática que fosforila canais iônicos. Entretanto, quando há o bloqueio do receptor M_3 pelos anticolinérgicos, este processo não ocorre, diminuindo a liberação de cálcio, e consequentemente, reduzindo a motilidade provocada pela diarreia. (UCHIYAMA, CHESS-WILLIAMS, 2004; KAMATO et al., 2015).

1.4.4 Antimicrobianos

Os antibióticos devem ser adequadamente selecionados quando há um diagnóstico preciso do agente etiológico da diarreia, e nos casos de diarreia do

viajante e quando houver uma alta suspeita ou risco de infecção bacteriana sistêmica (SASAKI et al., 2008). Os antimicrobianos mais eficazes incluem azitromicina e ciprofloxacino, que de acordo com a FDA (Food and Drug Administration), a classificação de risco à mulheres grávidas destes fármacos são as categoria B e C respectivamente, assim o primeiro é a escolha mais segura para essa população, e ciproflaxicino devem ser evitados por mulheres grávidas (SPIES, 2008). A incidência crescente de infecções resistentes aos antibióticos, efeitos colaterais do tratamento e a associação com complicações limitam a segurança e a eficácia dos agentes antimicrobianos. Os antibióticos devem ser especificamente evitados no caso da infecção por *Escherichia coli* O157 devido à associação do tratamento antibiótico com o desenvolvimento da síndrome uremia hemolítica (KENT; BANKS, 2010).

1.4.5 Probióticos

Outra classe de fármacos utilizada no tratamento da diarreia são os probióticos, definidos como micro-organismos vivos que, quando administrados em uma quantidade adequada, conferem um benefício para a saúde ao hospedeiro. As espécies probióticas mais estudadas são *Lactobacillus* sp, *Bifidobacterium* sp e VSL#3 (combinação de *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* e *Streptococcus* sp) e *Saccharomyces boulardii* que é uma levedura (LI; VAZIRI, 2012).

O mecanismo de ação desta classe provavelmente esteja relacionado à competição no intestino com micro-organismos patogênicos e possivelmente os probióticos secretam moléculas que inibem o crescimento do patógeno, no entanto, os benefícios dependem da cepa, da dose e da viabilidade dos micro-organismos utilizados nas preparações. Geralmente, os micro-organismos probióticos são administrados como esporos para resistir ao trânsito no meio altamente ácido do estômago e posteriormente germinar e proliferar no lúmen intestinal. Entretanto, não colonizam o trato gastrintestinal persistentemente e desaparecem das fezes quando o uso dos probióticos é interrompido (FAURE, 2013).

1.4.6 Plantas Medicinais

Além destes tratamentos, o uso de plantas medicinais durante episódios de diarreia é bastante difundido no Brasil, e suas potencialidades neste setor são reconhecidas mundialmente. Dentre as plantas utilizadas nesta patologia pela população, pode-se destacar o macerado da folha do mastruz (*Chenopodium ambrosioides* L.), decocto da folha da erva-doce (*Foeniculum vulgare* Mill.), macerado da folha de cânfora (*Artemisia camphorata* Vill.), infusão, maceração e decocção da folha de boldo (*Plectranthus neochilus* Schltr.), infusão das folhas de erva-cidreira (*Melissa officinalis* L.), decocto da folha e fruto de romã (*Punica granatum* L.) decocto da folha de goiabeira (*Psidium guajava* L.) O conhecimento tradicional é de interesse para a ciência por se tratar do acúmulo de saberes resultantes da observação sistemática realizada pela população (MESSIAS et al. 2015).

1.5 Pesquisa de Plantas Medicinais para o Tratamento da Diarreia

Estudos envolvendo plantas vêm crescendo a cada dia e são consideradas fontes potenciais de descoberta de fármacos. Muitas plantas medicinais são utilizadas para o tratamento da diarreia e distúrbios gastrintestinais, e algumas destas, têm seu potencial farmacológico comprovado cientificamente em modelos animais de diarreia. No entanto, poucas plantas foram clinicamente testadas através de ensaios controlados para avaliar a segurança e sua eficácia (RAWAT; SINGH; KUMAR, 2017).

A diarreia é uma das principais causas de mortalidade em comunidades rurais na África, e as plantas medicinais são uma fonte de esperança para estes pacientes que na maioria das vezes não conseguem atender aos custos sempre crescentes dos medicamentos. A eficácia das ervas medicinais utilizadas no tratamento da diarreia está a cada dia mais popular, desde que as propriedades de muitos constituintes fenólicos de plantas medicinais, como a sua capacidade de inibir *enteropooling* e diminuir o trânsito gastrintestinal, são muito úteis no controle da diarreia. No entanto, falta de padronização de métodos de preparação, condições inapropriadas de armazenamento e falta de incentivos a pesquisa, são questões que

afetam a eficácia e a prática da medicina tradicional nas comunidades rurais africanas (NJUME; GODUKA, 2012).

No Brasil, a diarreia também é uma das principais causas de morte, sobretudo na população infantil, e rotavírus é um dos principais agentes etiológicos da diarreia em lactentes e crianças menores que dois anos de idade em todo o mundo. Para combater a diarreia, a medicina brasileira tradicional usa uma grande variedade de plantas, e dentre elas os extratos de *Artocarpus integrifolia* L. – “Jaqueira”, *Myristica fragrans* Houtt. – “Noz-moscada” e *Spongias lutea* L. - “Cajazeiro”, podem ser úteis no tratamento de diarreia humana se o agente etiológico da patologia for o rotavírus (GONÇALVES et al., 2005).

Algumas plantas medicinais utilizadas tradicionalmente pela população demonstraram possuir excelente eficácia antidiarreica. Alguns dos extratos como de *Psidium guajava* L. (Goiabeira), *Mangifera indica* L. (Mangueiras), *Euphorbia hirta* L. (Eva-de-Santa-Luzia), *Punica granatum* L. (Romãzeira), *Oxalis barrelieri* L. (Azedinha), *Maytenus erythroxylon* Rissek (“Casca-grossa” ou “Bom nome”), *Cistus salviifolius* L. (Estevinha), *Spondias mombin* L. (Cajazeira), representaram atividade antidiarreica significativa com 80% -100% de inibição para os diferentes parâmetros testados. Esses extratos de plantas medicinais devem ser utilizados como fonte de descoberta de novos fármacos, realizando a identificação de moléculas ativas e posteriormente rigorosas pesquisas pré-clínicas e clínicas para garantir eficácia e segurança (HORE et al., 2006; PALOMBO, 2006; QNAIS et al., 2007; RAWAT; SINGH; KUMAR, 2017).

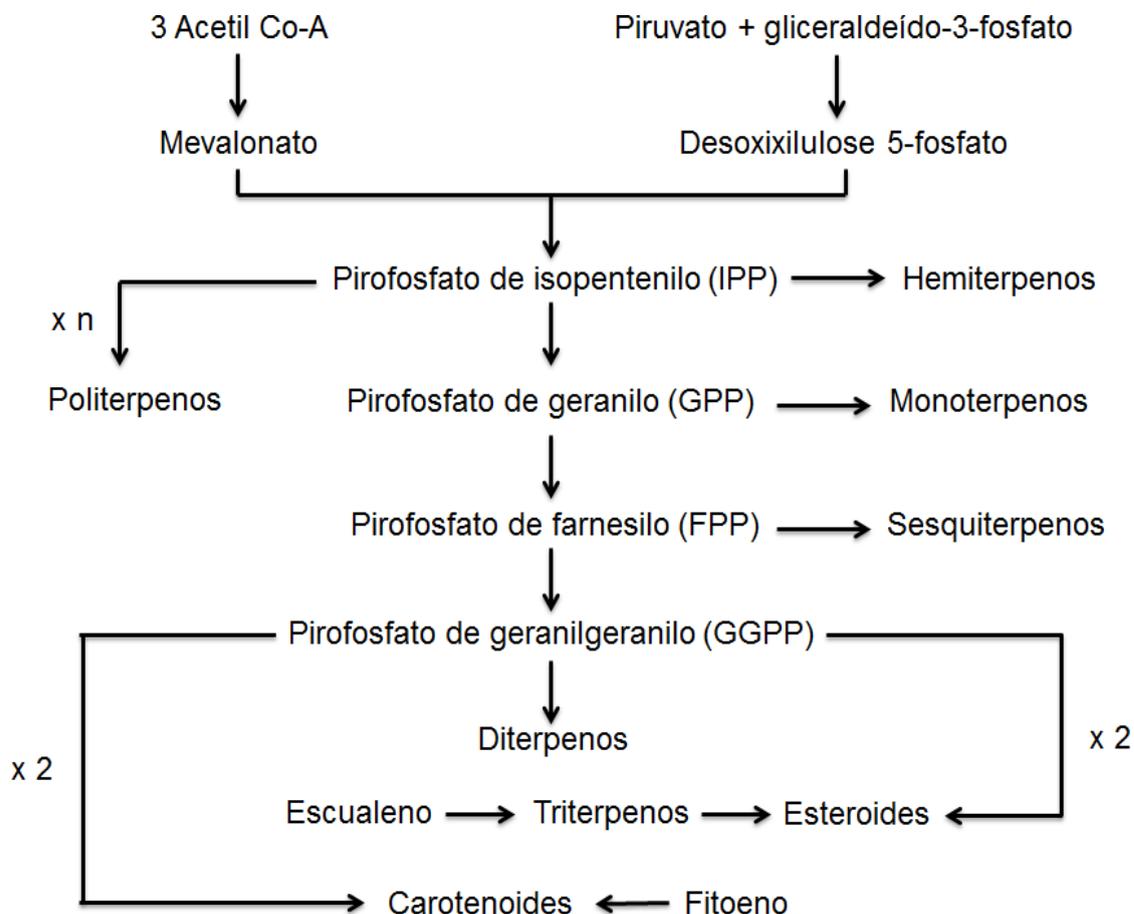
Apesar da abundante biodiversidade brasileira e das inúmeras publicações acadêmicas sobre plantas medicinais em revistas científicas internacionais e algumas patentes depositadas, poucos medicamentos foram derivados desses estudos. Portanto, devem ser feitos grandes esforços para melhorar o desenvolvimento do mercado de medicamentos derivados de plantas no Brasil, especialmente envolvendo a parceria entre academia e empresas farmacêuticas (DUTRA et al., 2016).

1.6 Ações Farmacológicas de Terpenos e Monoterpenos

Os terpenos ou isoprenóides são hidrocarbonetos que constituem o grupo mais abundante de metabolitos secundários em plantas superiores com cerca de 30.000 compostos. São classificados pelo número de unidades de isopreno (C_5H_8), sendo os mais comuns os monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}) e diterpenos (C_{20}) e juntamente com compostos aromáticos, constituem os óleos essenciais das plantas. Estudos demonstram que os terpenos possuem atividade na prevenção e terapia de várias patologias, incluindo câncer; atividade antimicrobiana, analgésica, anti-inflamatória, e na neuroproteção (CARVALHO; FONSECA, 2006; KIYAMA, 2017; MEWALAL et al., 2017).

Nas plantas, o difosfato de isopentenilo (IPP) e o difosfato de dimetilalilo (DMAPP) são os precursores dos terpenos e eles podem ser sintetizados através de duas vias compartimentadas. A via convencional de ácido acetato-mevalônico atua principalmente no citossol, retículo endoplasmático e nos peroxissomos e sintetiza principalmente esteróis, sesquiterpenos e ubiquinonas. Inicialmente há a união de três unidades de acetil CoA, levando a síntese de 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA, que posteriormente é catalisado pela 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA redutase em ácido mevalônico. Este último é convertido através do processo de fosforilação e descarboxilação em isopentenil pirofosfato, que é o produto final da via do ácido mevalônico da biossíntese de terpenoides. A via do ácido não mevalônico sintetiza hemiterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos. Esta via biossintética dos terpenos começa nos plastos através da condensação do piruvato e gliceraldeído-3-fosfato, o que conduz à síntese de desoxixilulose 5-fosfato. Este é reduzido a 2-metil eritritol 4-fosfato, que juntamente com 2,4-ciclodifosfato promovem a síntese de o 4-difosfato de hidroximetilbutenilo, e assim é convertido diretamente na mistura de difosfato de isopentenilo e difosfato de dimetilalilo, dando origem aos terpenos (Figura 7) (SINGH; SHARMA, 2015).

Figura 7: Síntese dos Terpenos

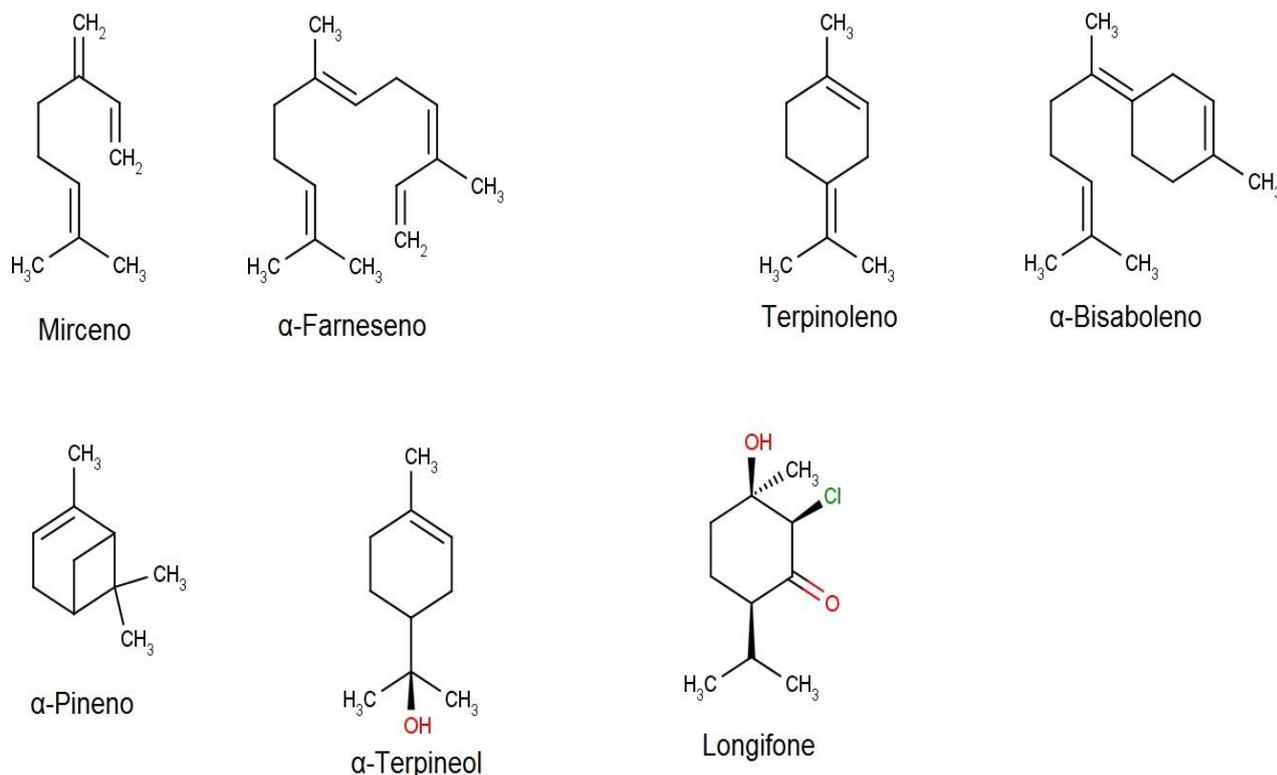


Dentre os terpenos, os monoterpenos e sesquiterpenos são os principais compostos em óleos essenciais e podem ter estruturas diversas (Figura 8), podendo ser acíclico (mirceno e α -farneseno), monocíclico (terpinoleno e α -bisaboleno) e bicíclico (α -pineno). Podem ser encontradas também estruturas com heteroátomos como oxigênio (α -terpineol) e cloreto (longifone) (LIMA et al., 2016).

Estudos demonstraram que os monoterpenos e seus derivados sintéticos possuem várias propriedades farmacológicas, incluindo atividades antifúngicas, antibacterianas, antioxidantes, anticancerígenas, antiarrítmicas, anti-agregadoras, anestésicas locais, antinociceptivas, anti-inflamatórias, anti-histamínicas e anti-espasmódicas (KOZIOL et al., 2014). Estudo demonstrou atividades antiespasmódicas e antisecretórias de 1,8-cineol e racionalizou o uso

tradicional da planta contendo vários níveis deste terpeno no tratamento de queixas gastrointestinais, como diarreia (JALILZADEH-AMIN; MAHAM, 2015).

Figura 8: Estrutura de mono e sesquiterpenos



1.7 Monoterpeno α -TPN

O α -TPN ou [2-(4-Methyl-1-cyclohex-3-enyl)propan-2-ol] é um álcool monoterpeneo volátil presente em óleos essenciais de diversas plantas como *Rosmarinus officinalis* L. (Alecrim) (MAY et al., 2010), *Melaleuca quinquenervia* (IRELAND et al., 2002), *Psidium guajava* L. (Goiabeira), *Mentha spicata* L. (Hortelã verde) (TROTTA et al., 2012), *Eucalyptus largiflorens* F. Muell (Caixa-preta) (RAHIMINASRABADI et al., 2013), *Illicium verum* Hook. (Anis estrelado) (FONSECA, et al., 2012), *Punica granatum* L. (Romãzeira) (QNAIS et al., 2007).

Este monoterpeneo é um produto comercial importante que é tipicamente aplicado em sabões e cosméticos, devido o seu odor agradável, sendo comercialmente disponível a preços relativamente baixos. É produzido

principalmente por via sintética, como pela ação de ácidos cloroacéticos sobre o limoneno, mostrando uma perspectiva promissora de bioprodução racional deste composto biotecnológico. O uso do bioprocessamento é uma alternativa adequada para aumentar a taxa de produção, rendimentos e eficiência de recuperação de compostos tão importantes derivados de terpenos (BICAS et al., 2008; ROTTAVA et al., 2011).

O α -TPN tem sido utilizado na investigação de possíveis propriedades farmacológicas e, nesses estudos foram relatados: efeitos sobre lesões gástricas (SOUZA et al., 2011; FERNANDES, 2016), efeito anti-hiperanalgésico em modelo de animal para fibromialgia (OLIVEIRA et al., 2016), atividade anticonvulsivante (SOUSA, QUINTANS-JÚNIOR, ALMEIDA, 2007), nociceptiva (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2011), propriedades anti-inflamatórias sobre a hipernocicepção mecânica (OLIVEIRA et al., 2012), efeito cardiovascular (SABINO et al., 2013), retenção gástrica provavelmente envolvendo sinalização colinérgica (SILVA et al., 2016), atividade anticancerígena através de um mecanismo que envolve a inibição da via NF-kappaB (HASSAN et al., 2010). Além disso, recentemente uma nova série de derivados de α -TPN foi sintetizada e demonstraram atividade de relaxamento do músculo liso da via aérea, apresentando assim, atividade antiasmática (ZHU et al., 2018).

Foram realizados também estudos de toxicidade aguda com o α -TPN pela via intraperitoneal, intramuscular e via oral em roedores para avaliar a segurança deste monoterpenteo. Pela via intraperitoneal, os ratos foram observados durante 72 horas e a dose letal (DL_{50}) obtida para 50% foi de 847 mg/kg; pela via intramuscular, os camundongos foram avaliados durante 48 horas e a DL_{50} obtida foi de 2000 mg/kg e, por via oral foram observados durante 7 dias, e a DL_{50} foi de 2900 mg/kg (YAMAHARA et al., 1985; BHATIA; LETIZIA; API, 2008).

Como o α -TPN apresenta baixa toxicidade demonstrando sua segurança, possui muitas atividades farmacológicas comprovadas, inclusive no trato gastrointestinal, e está presente em várias plantas medicinais utilizadas pela população para o tratamento da diarreia, e em plantas que já tiveram atividade antidiarreica comprovada, este monoterpeneo demonstra ser um possível candidato ao tratamento de doenças diarreicas.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Investigar a atividade antidiarreica do monoterpeno α -TPN em modelos experimentais de diarreia osmótica, inflamatória e secretória, e possíveis mecanismos envolvidos na atividade evidenciada.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a atividade antidiarreica do α -TPN em modelo de diarreia osmótica induzida por óleo de rícino;
- Analisar se α -TPN possui efeito inibitório no trânsito gastrointestinal;
- Demonstrar se o efeito de α -TPN envolve mecanismo opioide e/ou colinérgico;
- Avaliar o efeito antidiarreico do α -TPN no modelo de *enteropooling* induzido por PGE₂ em camundongos;
- Observar o efeito antissecretório do α -TPN em modelo de diarreia secretora induzida pela toxina da cólera (CT);
- Determinar a concentração de íons cloreto no fluido intestinal demonstrando o efeito do α -TPN no efluxo destes íons induzido pela CT;
- Investigar o efeito do α -TPN sobre a absorção intestinal em alças isoladas de camundongos;
- Analisar uma possível interação do α -TPN com receptores GM1 através de ensaio (ELISA).

Metodologia

3 METODOLOGIA

3.1 Drogas e Reagentes

Durante a pesquisa, foram utilizados Óleo de Rícino, α -TPN (Alfa-terpineol), Prostaglandina E₂ (PGE₂), Sulfato de Atropina, Cloridrato de Betanecol, Toxina da Cólera (CT) e Monossialogangliosídeo-GM1, obtidos a partir da Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA. 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 substâncias foram dissolvidas em solução tampão fosfato-salina (PBS) ou solução salina.

3.2 Animais e Condições Pré-Experimentais

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos *Swiss* (pesando de 25 a 30 g), machos e fêmeas, provenientes do Biotério Setorial. Os animais foram acondicionados em gaiolas sob condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), com ciclo claro/escuro de 12 horas e livre acesso à água e ração, sendo submetidos a um jejum de 18 h antes da execução dos protocolos experimentais. Os grupos experimentais foram compostos por 6-7 animais para o tratamento com o monoterpeneo em estudo, fármaco de referência e grupo veículo tratado com salina ou PBS.

Os procedimentos referentes à eutanásia dos animais foram realizados em consonância com Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Durante o uso de animais foram seguidos os princípios e normas para utilização de animais em projetos de pesquisa e todos os procedimentos experimentais deste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Piauí (Parecer nº 303/17).

3.3 Efeito do α -TPN na diarreia induzida por óleo de rícino em roedores

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, na qual os animais permaneceram sob condições mencionadas anteriormente. Os camundongos foram divididos em grupos contendo 6 animais (Figura 9), na qual nos grupos α -TPN (6,25; 12,5; 25; 50 mg/kg) as doses foram escolhidas a partir dos trabalhos de Oliveira et al. (2012), Fernandes (2016) e Silva (2016). Após 1h dos tratamentos com fármaco padrão (loperamida), substância testada (α -TPN), ou veículo, a diarreia foi induzida nos grupos experimentais por administração do óleo de rícino (10 mL/kg, v.o.).

Posteriormente, foi observada a ocorrência de fezes diarreicas caracterizadas como fezes aquosas ou não formadas, na qual os animais serão 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 (mg) 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:

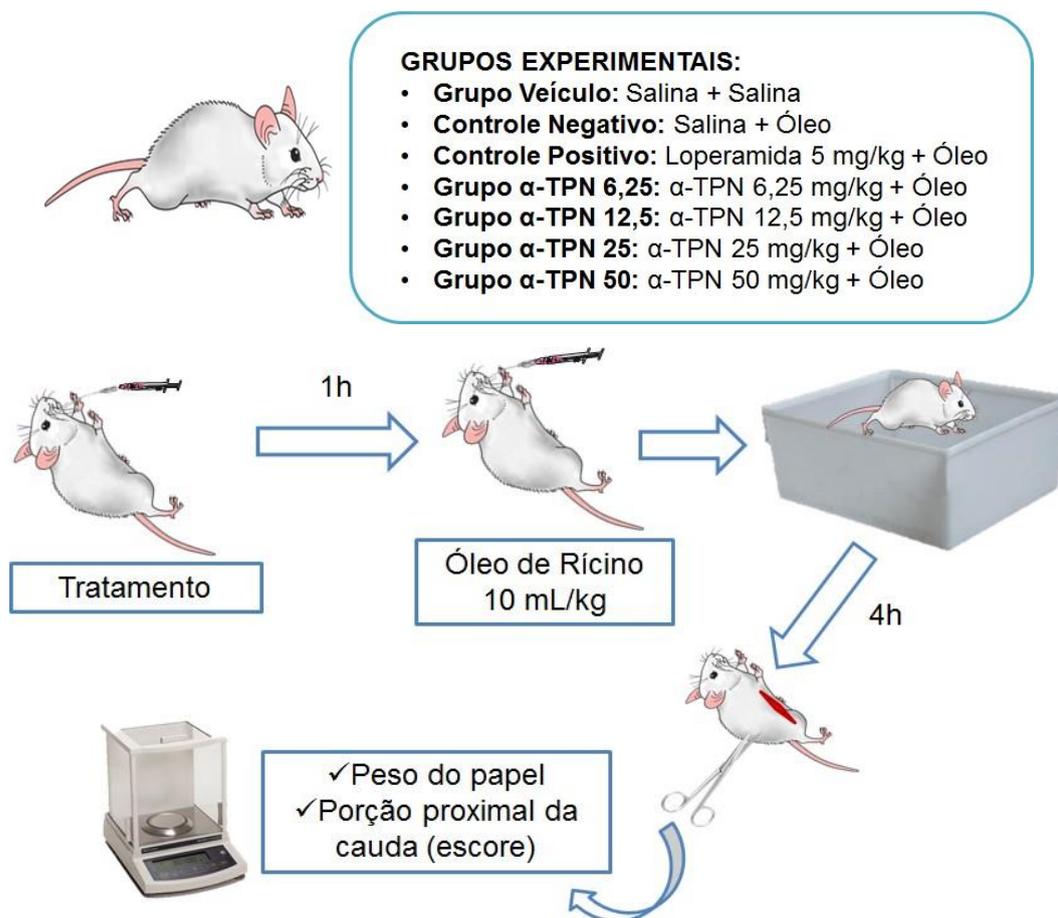
$$\% \text{ Inibição de defecação/diarreia} = [(A - B) / A] \times 100$$

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 substância em estudo (α -TPN).

Figura 9: Representação esquemática do protocolo experimental de indução de diarreia por óleo de rícino



3.4 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. 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 α -TPN (6,25; 12,5; 25 e 50 mg/kg, v.o.) ou loperamida (5 mg/kg, v.o.), enquanto o grupo veiculo 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 (Figura

10) e a avaliação da porcentagem de inibição da secreção de fluido intestinal prosseguiu da seguinte forma:

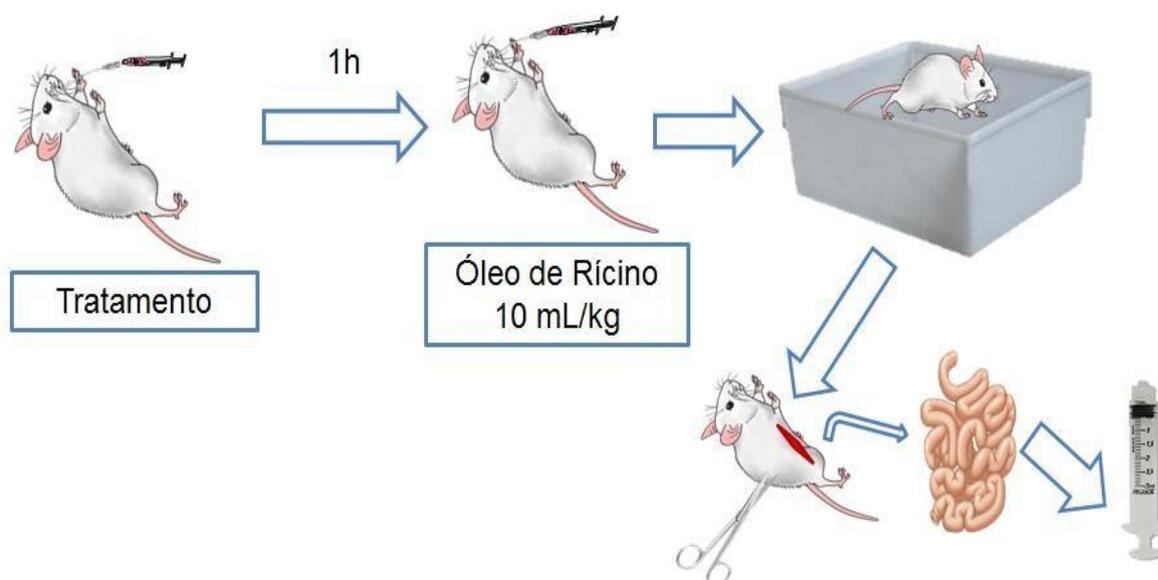
$$\% \text{ Inibição do volume intestinal} = [(A - B) / A] \times 100$$

Onde:

A → significa o volume da secreção de fluido intestinal provocada por óleo de rícino;

B → indica o volume da secreção de fluido intestinal após o tratamento com a droga padrão ou substância em estudo (α -TPN).

Figura 10: Representação esquemática do protocolo experimental de *Enteropooling*



3.5 Avaliação da motilidade gastrointestinal estimulada por óleo de rícino

Através da utilização do método descrito por DiCarlo et al. (1994), com algumas modificações, foi avaliado o efeito do monoterpeno α -TPN 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 atividade anticolinérgica na resposta do α -TPN na redução da

motilidade gastrointestinal. Deste protocolo em diante, foi utilizada a melhor dose do α -TPN obtida no protocolo de *enteropooling*, que foi de 12,5 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, α -TPN (12,5 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, os camundongos foram eutanasiados e o intestino delgado foi removido e estendido em uma superfície limpa (Figura 11). Em seguida, foi calculada a distância percorrida pelo carvão (marcador) em relação ao comprimento total do intestino delgado e essa distância foi calculada da seguinte forma:

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

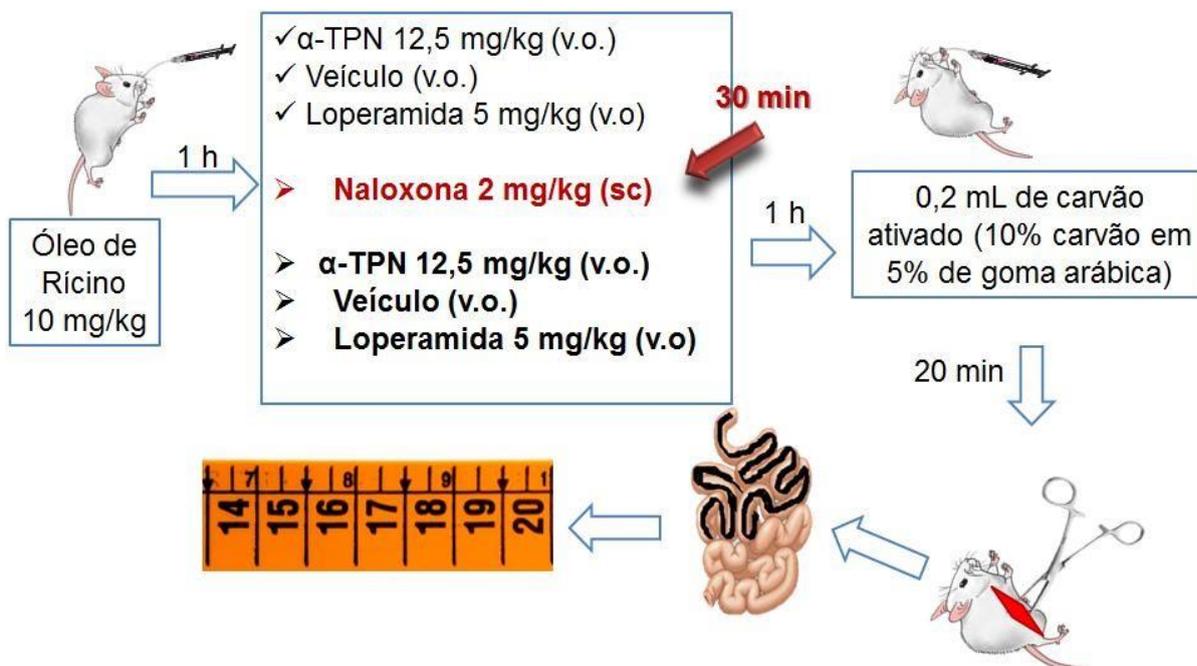
Onde:

A → representa a distância percorrida pelo carvão;

B → representa o comprimento total do intestino.

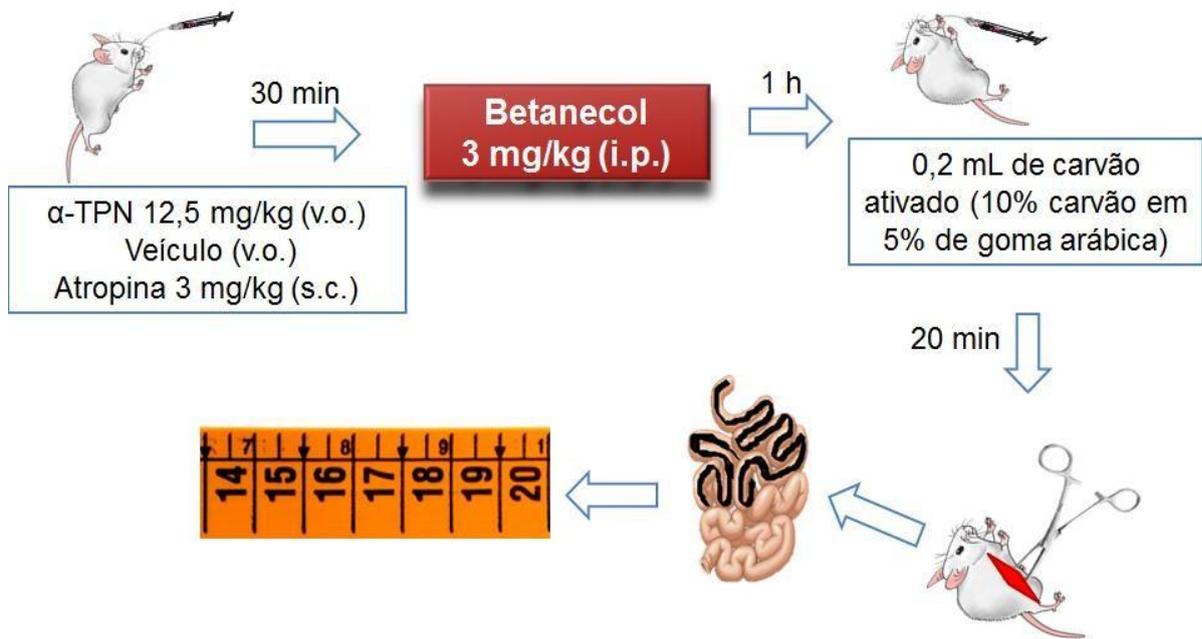
Na segunda etapa do experimento, foi examinado um possível envolvimento do sistema opioide no efeito do α -TPN na redução do trânsito gastrointestinal induzido por óleo de rícino. Então, foi utilizado outros grupos de animais, nos quais foi administrado nos camundongos, naloxona (2 mg/kg, s.c.), um antagonista opioide, e após 30 min, foram tratados por via oral com salina, α -TPN (12,5 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 (Figura 9).

Figura 11: Representação esquemática do protocolo experimental de motilidade gastrointestinal e modulação opioide



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 de α -TPN 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.), α -TPN (12,5 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 10).

Figura 12: Representação esquemática do protocolo experimental da modulação colinérgica

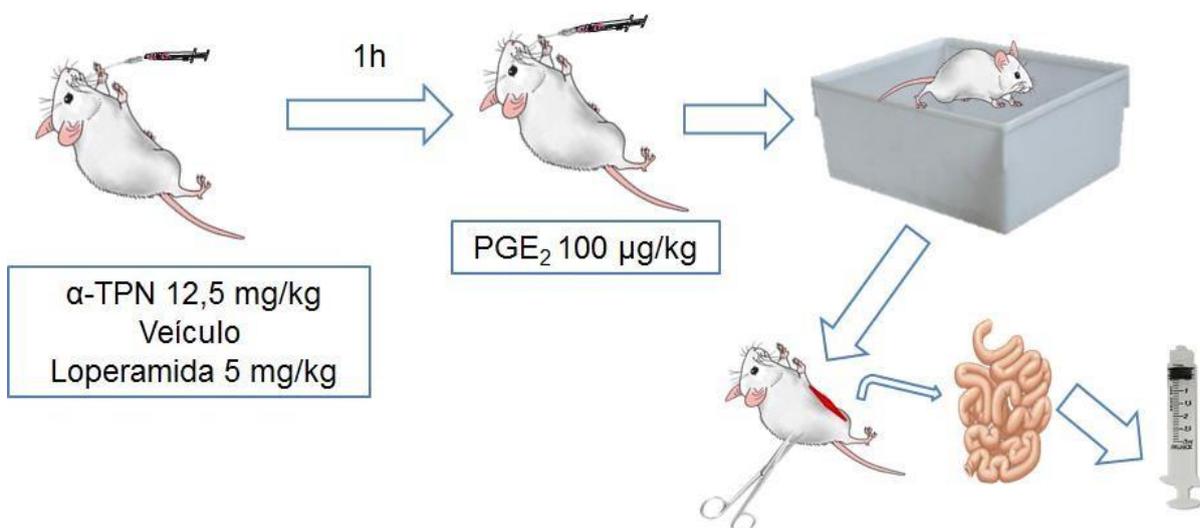


3.6 Enteropooling induzido por PGE₂

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 salina (2,5 mL/kg, v.o.), α -TPN (12,5 mg/kg, v.o.) ou loperamida (5 mg/kg, v.o.). Imediatamente após os tratamentos, a diarreia foi induzida por PGE₂ (Prostaglandia E₂) (100 μ g/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 (Figura 13). 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 13: Representação esquemática do protocolo experimental de indução de diarreia por PGE₂ e de acúmulo de fluido intestinal (*enteropooling*)



3.7 Avaliação da secreção de fluido induzida pela toxina da cólera em alças intestinais isoladas de camundongos tratados com α -TPN

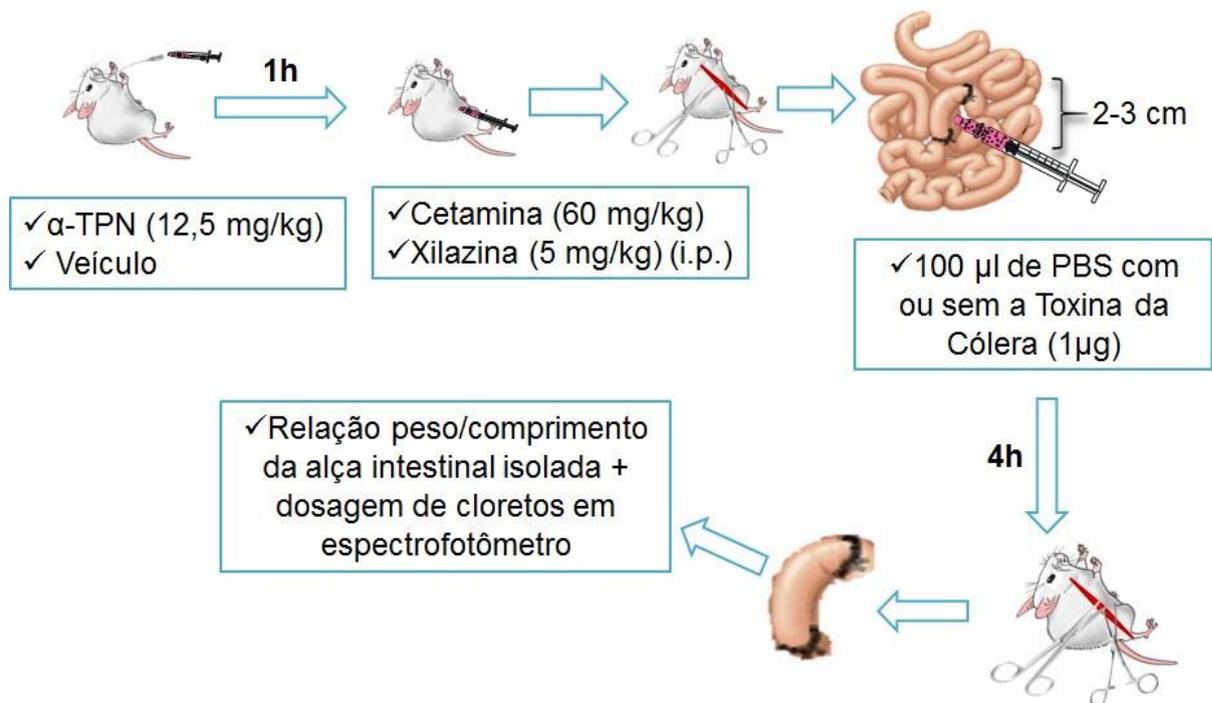
O método descrito por Tradtrantip; Ko & Verkman (2014) foi utilizado para avaliar o efeito de α -TPN sobre a secreção de fluido intestinal induzida pela inoculação da toxina da cólera (CT). Os animais do grupo veículo foram pré-tratados com solução salina (2,5mL/kg, v.o.) e o grupo teste com o monoterpeneo α -TPN (12,5 mg/kg, v.o.).

Os animais foram anestesiados com cloridrato de xilazina (5 mg/kg) e cetamina (60 mg/kg) por via intraperitoneal e após uma hora foram laparatomizados para visualizar e expor o intestino delgado. Logo após, uma porção do jejuno foi isolada e fechada com dupla laçada formando uma alça intestinal medindo aproximadamente 2-3 cm. Em seguida, as alças intestinais do grupo controle negativo foram inoculadas com 100 μ L de solução salina tamponada com fosfato (PBS), e o grupo positivo e grupo teste foram inoculados com toxina da cólera dissolvida em PBS a uma dose de 1 μ g/alça. As alças intestinais foram então recolocadas na cavidade abdominal e a incisão abdominal foi suturada.

Quatro horas após, os animais foram eutanasiados e as alças isoladas foram removidas da cavidade abdominal, e através da relação do peso/comprimento da

alça, foi mensurada a secreção de fluido intestinal em g/cm. Por fim, o conteúdo intestinal acumulado em cada alça isolada foi recolhido para mensurar a concentração de íons cloreto (Cl^-) (Figura 14).

Figura 14: Representação esquemática do protocolo experimental de avaliação da secreção de fluido induzido pela toxina da cólera em alças intestinais isoladas de camundongos tratados com α -TPN



3.8 Determinação da concentração de íons cloreto no fluido intestinal

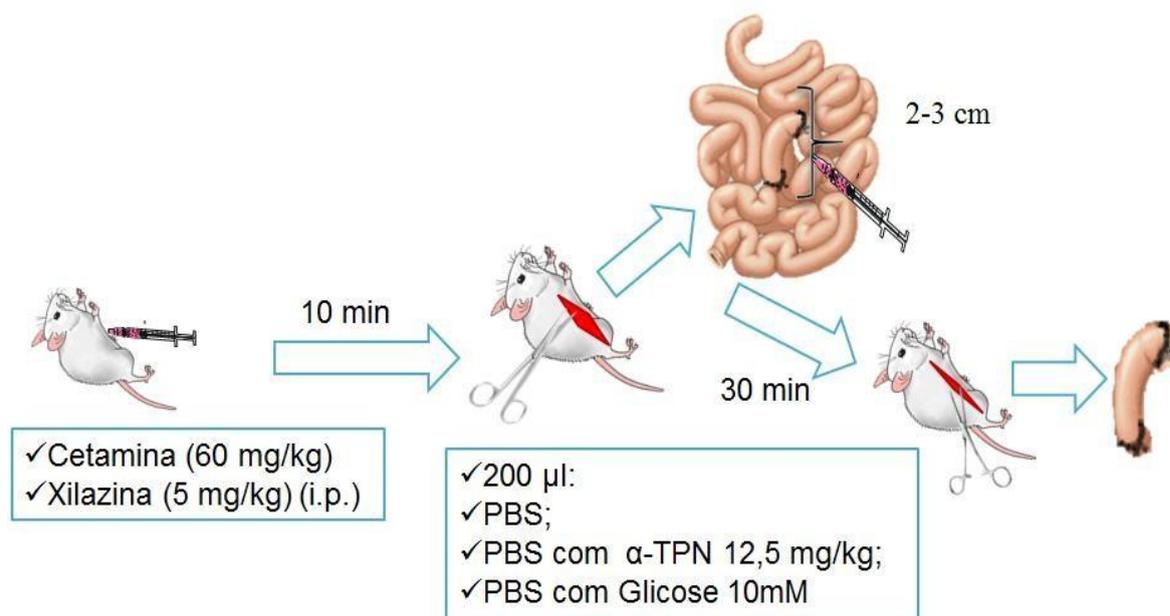
Para mensurar a concentração de íons cloreto no fluido intestinal acumulado em cada alça isolada foi seguido o protocolo de acordo com as instruções do fabricante (Labtest, São Paulo, Brasil). O conteúdo das alças intestinais passaram por centrifugação a 4000 rpm durante 10 min e o sobrenadante foi recolhido e diluído de 1:2 com água destilada. Em seguida, as amostras foram misturadas com os reagentes do kit durante dois minutos e a absorbância foi medida em espectrofotômetro a 470 nm, na qual os valores obtidos foram expressos em mEq/L.

3.9 Avaliação da absorção intestinal em alças intestinais isoladas de camundongos tratados com α -TPN

O método utilizado foi o descrito por Tradtrantip; Ko; Verkman (2014), para verificar efeito do α -TPN na absorção intestinal. As alças intestinais isoladas foram obtidas como descrito no protocolo anterior e estas foram inoculadas com 200 μ L de PBS (controle negativo), PBS contendo 10 mM de glicose (controle positivo para a absorção de fluidos), ou PBS contendo o α -TPN (12,5 mg/kg).

As alças intestinais foram recolocadas na cavidade abdominal e os animais foram suturados. Após 30 min, os camundongos foram eutanasiados, a cavidade abdominal foi reaberta e as alças intestinais isoladas foram retiradas. Logo após, as alças foram pesadas com e sem o conteúdo luminal e o volume do conteúdo intestinal foi calculado pela subtração dos dois valores (Figura 15). E a porcentagem de absorção de fluido foi avaliada pela relação do peso/comprimento da alça isolada.

Figura 15: Representação esquemática do protocolo experimental de avaliação da absorção em alças intestinais isoladas de camundongos tratados com α -TPN



3.10 Avaliação da Ligação do α -TPN ao Receptor GM1 (Ensaio GM1-ELISA)

O método descrito por Saha et al. (2013) foi utilizado para avaliar a capacidade de ligação do α -TPN ao receptor GM1 através de análise por técnica de ELISA (GM1-ganglioside enzyme-linked immunosorbent assay/GM1-ELISA). Inicialmente, uma solução (2 μ g/mL) de monossialogangliosídeo-GM1 adquirida a partir de cérebro bovino (100 μ L em PBS, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) foi adicionada a microplacas de 96 poços (Global Plast, China) e foram incubadas durante *overnight* a temperatura ambiente. Os locais de ligação extras foram bloqueados por adição de 200 μ L de BSA (Albumina Sérica Bovina 1% p/v dissolvido em PBS, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), e incubado durante 30 min a 37 °C. Logo após, as placas foram lavadas três vezes com PBS contendo 0,05% v/v de Tween 20 (etapa de lavagem) e as amostras contendo a CT (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), com e sem concentrações de α -TPN (1 a 500 μ g/mL) foram diluídas em série, depois adicionadas às placas de microtitulação e incubadas à temperatura ambiente durante 2 h. Em seguida foi feita uma lavagem e foi adicionado 100 μ L de um anticorpo apropriado diluído 1:2000 em PBS.

Foram utilizados anticorpo anti-toxina da cólera produzido em coelho (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) para o ensaio de GM1-ELISA, seguido de um anticorpo anti-imunoglobulina G de coelho produzido em cabras conjugada com uma peroxidase (GE Healthcare, Amersham Place, UK). Em seguida, as placas foram incubadas durante 1h à temperatura ambiente, lavadas e incubadas com uma solução fresca de 3, 30, 5, 50-tetrametilbenzidina (TMB) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) durante 15 min à temperatura ambiente. Por meio de um leitor de ELISA (Bio-Rad) a 492 nm foi mensurada a intensidade da cor. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e validados a partir de uma curva padrão de concentrações conhecidas de CT (100 a 1,56 ng/mL) para estimar a quantidade de CT nos poços, enquanto que no controle negativo os poços estavam sem GM1 adsorvido.

3.11 Dados e Análise Estatística

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 monoterpeno 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 $p < 0,05$.

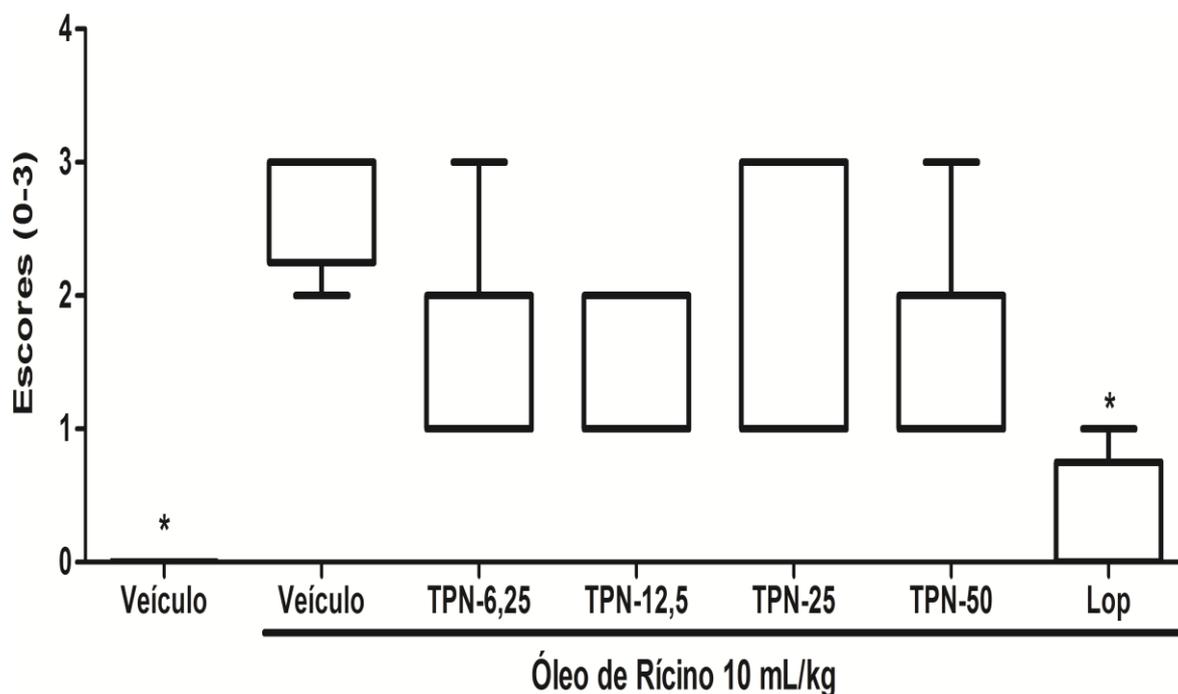
Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Escores de severidade e Efeito do α -TPN sobre a redução da diarreia induzida por óleo de rícino

As doses administradas de α -Terpineol (6,25; 12,5; 25; 50 mg/kg) não diminuíram significativamente os escores de severidade diarreica (Figura 16), que são determinados após o período de quatro horas de indução à diarreia provocada pelo óleo de rícino ao observar a sujidade gerada pela diarreia na região anogenital dos animais.

Figura 16: Escores de severidade diarreica pelo α -TPN em modelo diarreia induzida por óleo de rícino em camundongos



Legenda: Quatro horas após a administração oral de óleo de rícino, todos os camundongos do grupo veículo+óleo de rícino produziram diarreia abundante. O pré-tratamento dos animais com α -TPN (6,25; 12,5; 25; 50 mg/kg, v.o), não reduziu a severidade da diarreia e a pontuação geral dos escores. A droga antidiarreica padrão, loperamida (5 mg/kg, v.o), produziu um efeito inibidor significativo. Os valores estão expressos como média \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; α -TPN, α -Terpineol.

Nos experimentos realizados de indução de diarreia, observa-se que em todas as doses testadas (6,25; 12,5; 25; 50 mg/kg), o α -TPN foi eficaz em reduzir a massa total de fezes ($1,84 \pm 0,2g/ 54,90\%$; $2,12 \pm 0,08g/ 48,03\%$; $2,27 \pm 0,07g/ 44,36\%$; $3,12 \pm 0,2g/ 23,52\%$, respectivamente) e a massa total de fezes diarreicas no prazo de 4 horas após a administração do óleo de rícino, em comparação com o grupo controle ($0,30 \pm 0,03g$). Este experimento demonstrou que o α -TPN também reduziu a diarreia de modo geral (47,11%; 65,95%; 55,62%, 10,33%, respectivamente) quando comparado com o controle. É válido ressaltar que a dose que apresentou maior eficácia na redução do total de fezes diarreicas e na inibição da diarreia foi a dose de 12,5 mg/kg (Tabela 2).

Tabela 2 - Efeito de α -TPN 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 (%)
Veículo (2,5 ml/kg)	$0,30 \pm 0,03^*$	-	$0,10 \pm 0,01^*$	-
Óleo de Rícino (10 ml/kg)	$4,08 \pm 0,1$	-	$3,29 \pm 0,12$	-
α-TPN-6,25 mg/kg	$1,84 \pm 0,2^*$	54,90	$1,74 \pm 0,1^*$	47,11
α-TPN-12,5 mg/kg	$2,12 \pm 0,08^*$	48,03	$1,12 \pm 0,09^*$	65,95
α-TPN-25 mg/kg	$2,27 \pm 0,07^*$	44,36	$1,46 \pm 0,05^*$	55,62
α-TPN-50 mg/kg	$3,12 \pm 0,2^*$	23,52	$2,95 \pm 0,2$	10,33
Loperamida (5 mg/kg)	$0,23 \pm 0,04^*$	94,36	$0,11 \pm 0,02^*$	96,65

Os valores estão expressos como média \pm SEM (n = 5-7). *p <0,05 quando comparado com o grupo Óleo de Rícino.

4.2 Redução da geração de fluido intestinal pelo α -TPN na diarreia induzida por óleo de rícino

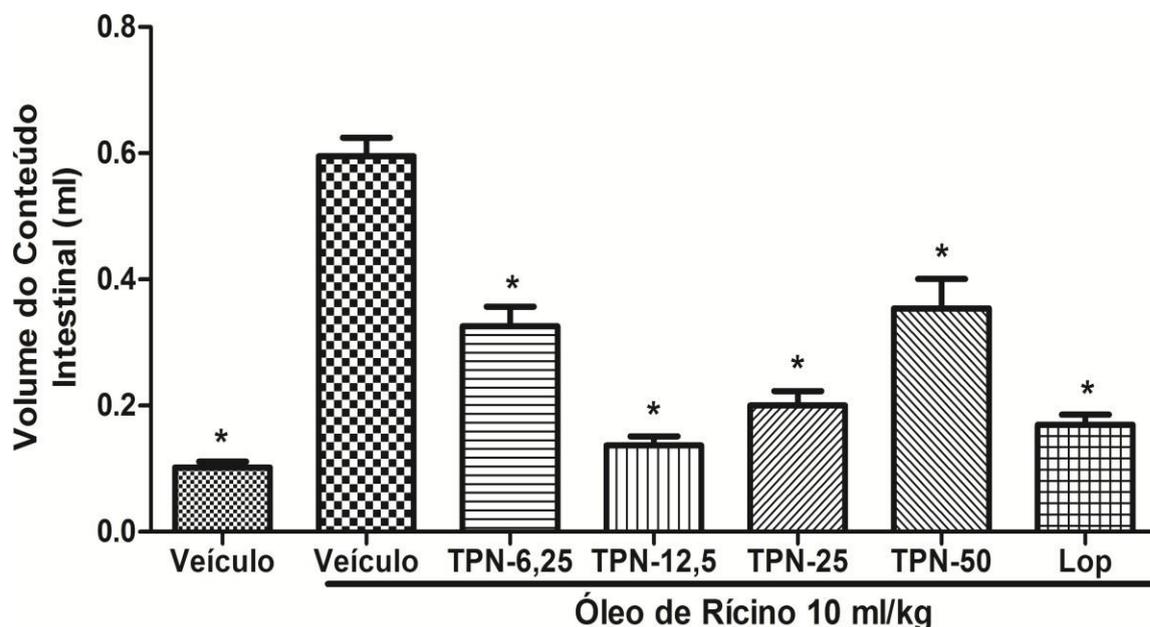
Para avaliar a geração de fluidos durante o processo diarreico, foi utilizado o teste de *enteropooling* como forma avaliativa para este parâmetro. Todas as doses de α -TPN (6,25; 12,5; 25; 50 mg/kg) reduziram significativamente o volume de fezes intestinais (45,76%; 77,96%; 66,10%; 40,67%, respectivamente) quando comparado com o controle (Tabela 3), demonstrando o fenômeno de hormese (Figura 17). 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 12,5 mg/kg obteve os melhores resultados frente as outras doses, e portanto, utilizou-se esta como a dose padrão para os testes seguintes.

Tabela 3 - Efeito do α -TPN sobre o *enteropooling* induzido por óleo de rícino em camundongos.

Tratamento (v.o.)	Diferença de peso do conteúdo intestinal (g)	Volume do conteúdo intestinal (ml)	Inibição (%)
Veículo (2,5 ml/kg)	1,76 \pm 0,04	0,10 \pm 0,01*	-
Óleo de Rícino (10 ml/kg)	2,37 \pm 0,05	0,59 \pm 0,02	-
α -TPN-6,25 mg/kg	1,94 \pm 0,03	0,32 \pm 0,03*	45,76
α -TPN-12,5 mg/kg	1,65 \pm 0,04	0,13 \pm 0,01*	77,96
α -TPN-25 mg/kg	1,99 \pm 0,04	0,20 \pm 0,02*	66,10
α -TPN-50 mg/kg	2,25 \pm 0,06	0,35 \pm 0,04*	40,67
Loperamida (5mg/Kg)	1,55 \pm 0,10	0,17 \pm 0,01*	70,64

Os valores estão expressos como média \pm EPM (n = 5-7). *p <0,05 quando comparado com o grupo Óleo de Rícino

Figura 17: Efeito do α -TPN sobre o *enteropooling* induzido por óleo de rícino em camundongos.

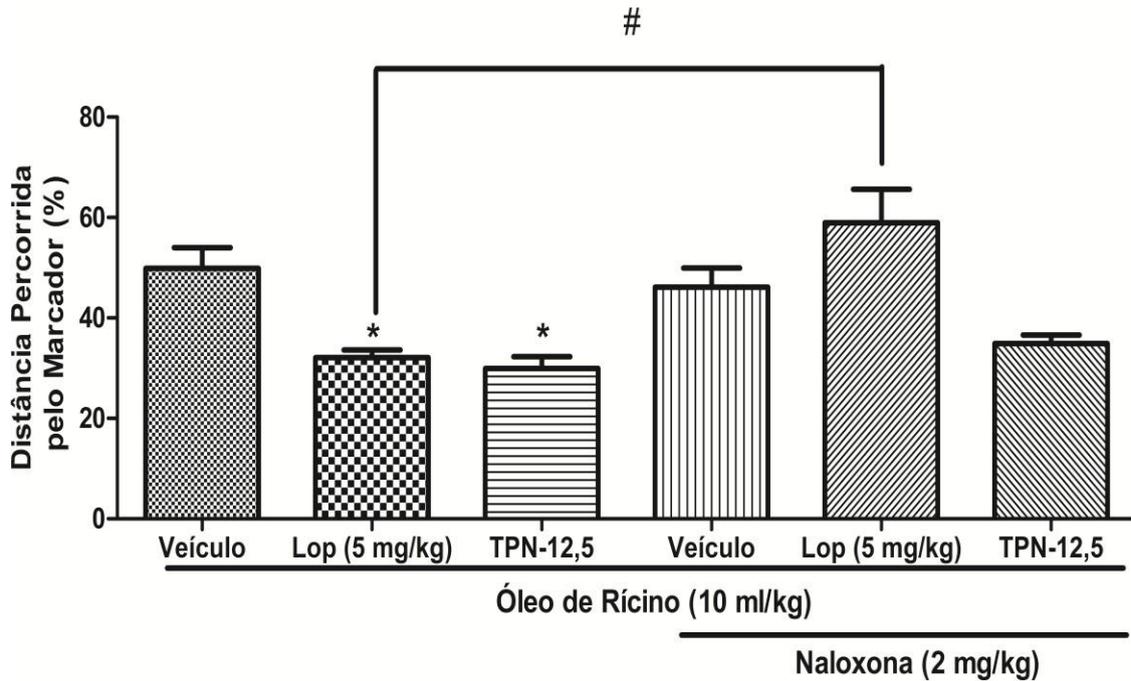


Os valores estão expressos como média \pm EPM (n = 5-7). * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo veículo+óleo de rícino

4.3 Efeito do α -TPN sobre o trânsito intestinal mediado pelo sistema opioide

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 α -TPN ficou em torno de $29,96 \pm 2,31\%$ do comprimento total do intestino, valor este significativamente menor ($p < 0,05$; Figura 10) do que o observado no grupo que recebeu salina e óleo de rícino ($49,87 \pm 4,16\%$). Na análise seguinte, pode-se observar que o grupo que recebeu naloxona e α -TPN ao ter a motilidade estimulada com óleo de rícino apresentou a distância média percorrida pelo marcador de $34,92 \pm 1,67\%$ e não apresentou diferença estatística quando comparado com o grupo que foi pré-tratado com α -TPN da primeira análise (Figura 18).

FIGURA 18: Atividade do α -TPN no trânsito intestinal induzido por óleo de rícino em camundongos e modulação do sistema opioide

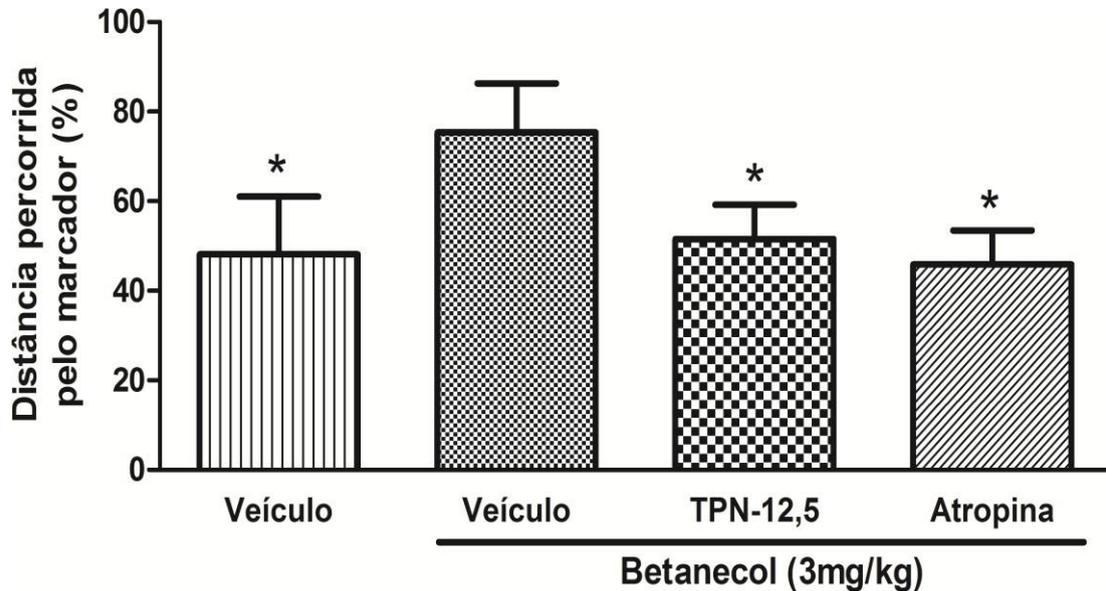


Legenda: Todos os animais receberam óleo de rícino para a produção de diarreia. No grupo de animais tratados com α -TPN (12,5 mg/kg, v.o) houve diminuição significativa ($*p<0,05$) do trânsito intestinal, a partir da distância marcada pelo carvão através do intestino delgado e o pré-tratamento do grupo de α -TPN 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; $\#p<0,05$ quando compara-se os grupos Lop+óleo de rícino e Lop+Naloxona+óleo de rícino. Análise estatística: ANOVA seguido do teste de Tukey.

4.4 Avaliação da participação muscarínica sobre o trânsito gastrointestinal de camundongos

Nos resultados abaixo, pode-se notar que o carvão percorreu uma distância média de 48,08% do intestino delgado no grupo salina. O grupo de animais que foram tratados apenas com solução salina e betanecol (3mg/kg) obtiveram média de 75,36% do percurso intestinal, valor este significativo, quando comparado com os animais usados como grupo veículo. Os grupos de animais que foram tratados com α -TPN (12,5 mg/kg) e atropina (3 mg/kg) apresentaram valores médios de distância percorrida pelo carvão no intestino delgado de 51,55% e 45,87%, respectivamente, que são significativamente menores ($p<0,05$) do que o grupo que recebeu o betanecol (Figura 19).

Figura 19: Efeito do α -TPN 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 α -TPN (12,5 mg/kg) e 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, α -TPN 12,5+betanecol, atropina+betanecol. Análise estatística: ANOVA seguido do teste de Tukey.

4.5 Efeito do α -TPN sobre os parâmetros de diarreia causados por PGE₂

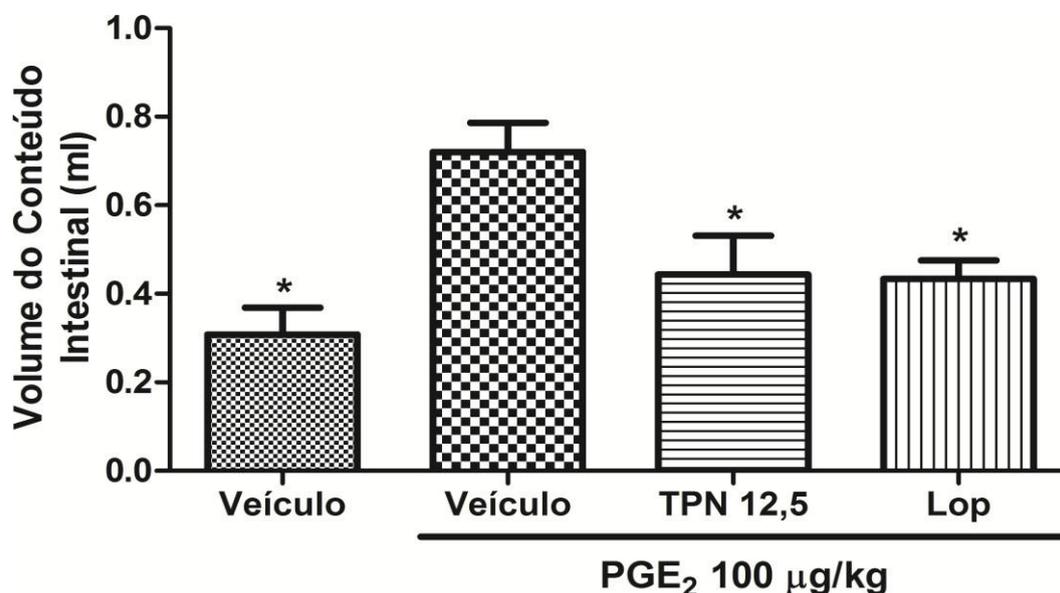
Nos resultados, foi possível observar que o tratamento com α -TPN reduziu o fluido intestinal em 38,8% em camundongos com *enteropooling* induzido por PGE₂, sendo estes dados estatisticamente significativos (Tabela 4; Figura 20), pois o α -TPN foi capaz de reduzir a geração de fluidos intestinais causada pela ação da PGE₂ no intestino.

Tabela 4: Efeito do α -TPN sobre o *enteropooling* induzido por PGE₂ em camundongos

Tratamento (v.o.)	Diferença de peso do conteúdo intestinal (g)	Volume do conteúdo intestinal (ml)	Inibição (%)
Veículo	0,71±0,03	0,30±0,06*	-
PGE ₂ (100 μ g/kg)	1,17±0,08	0,72±0,06	-
α -TPN (12,5 mg/kg)+ PGE ₂ (100 μ g/kg)	0,97±0,1	0,44±0,08*	38,8
Lop (5 mg/kg) + PGE ₂ (100 μ g/kg)	0,66±0,05	0,43±0,03*	40,27

Os valores estão expressos como média \pm EPM (n = 5-7). *p <0,05 quando comparado com o grupo PGE₂

Figura 20: Efeito do α -TPN sobre o *enteropooling* induzido por PGE₂ em camundongos



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

4.6 Efeito inibitório do α -TPN sobre o acúmulo de fluido intestinal gerado pela toxina da cólera em alças intestinais isoladas em camundongos

O resultado apresentado na figura 21-A/B demonstra a avaliação da geração de fluidos intestinais durante o processo promovido pela toxina, a partir do isolamento de alças intestinais. O grupo controle positivo que recebeu toxina da cólera ($0,1102 \pm 0,014$ g/cm) apresentou acúmulo de fluido na alça. No entanto, o α -TPN foi eficaz em reduzir as perdas de fluido causados pela CT a uma concentração de $1 \mu\text{g/alça}$ no período de quatro horas, onde os valores no grupo tratado com α -TPN ($0,0656 \pm 0,005$ g/cm) foram estatisticamente semelhantes ao grupo veículo ($0,0529 \pm 0,005$ g/cm) (Fig. 21-A/B), evidenciando que o α -TPN pode contribuir para redução da geração de fluidos durante a diarreia induzida pela toxina da cólera.

4.7 Efeito do α -TPN sobre a concentração de íons cloreto no lúmen intestinal de alças isoladas em camundongos

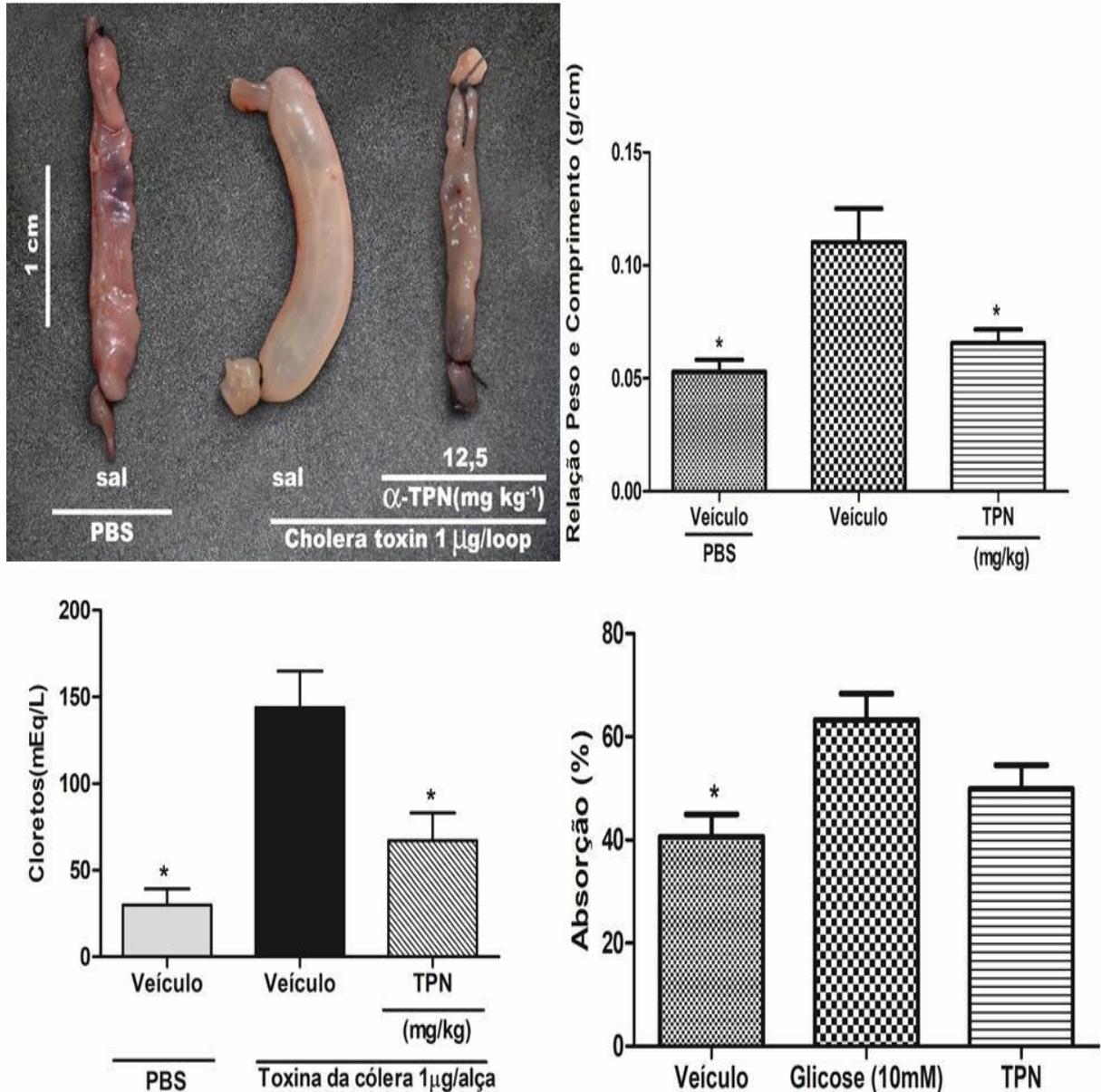
O resultado representa os níveis de íons cloreto (Cl^-), na qual os animais que receberam tratamento com α -TPN apresentaram redução significativa de perdas de íons cloreto para o meio extracelular (Figura 21-C), em comparação com os animais que apenas receberam a toxina da cólera inoculada na alça intestinal, sendo esta dosagem realizada por espectrofotometria. Os níveis de cloreto no grupo tratado com α -TPN foram reduzidos ($67,07 \pm 16,08$ mEq/l), quando comparado com o grupo que recebeu somente a toxina ($144,0 \pm 20,99$ mEq/L), corroborando o achado anterior a respeito sobre a redução da geração de fluidos.

4.8 Efeito do α -TPN sobre a absorção de fluidos em alças intestinais isoladas em camundongos

Os determinantes da acumulação de fluido intestinal incluem a secreção de fluido e absorção. Analisando os resultados dos níveis de absorção de fluido em alças intestinais isoladas, observou-se que o nível de absorção de fluido intestinal na presença de α -TPN não afetou a absorção de fluido intestinal ($49,92 \pm 4,57\%$) de forma significativa quando comparado ao grupo PBS ($40,63 \pm 4,32\%$) ou grupo de

glicose ($63,20 \pm 5,19\%$), mostrando que o α -TPN pode atuar por meio de reabsorção de fluidos na diarreia colérica (Figura 21-D).

Figura 21: Efeito do α -TPN sobre a absorção de fluidos em alças intestinais isoladas em camundongos

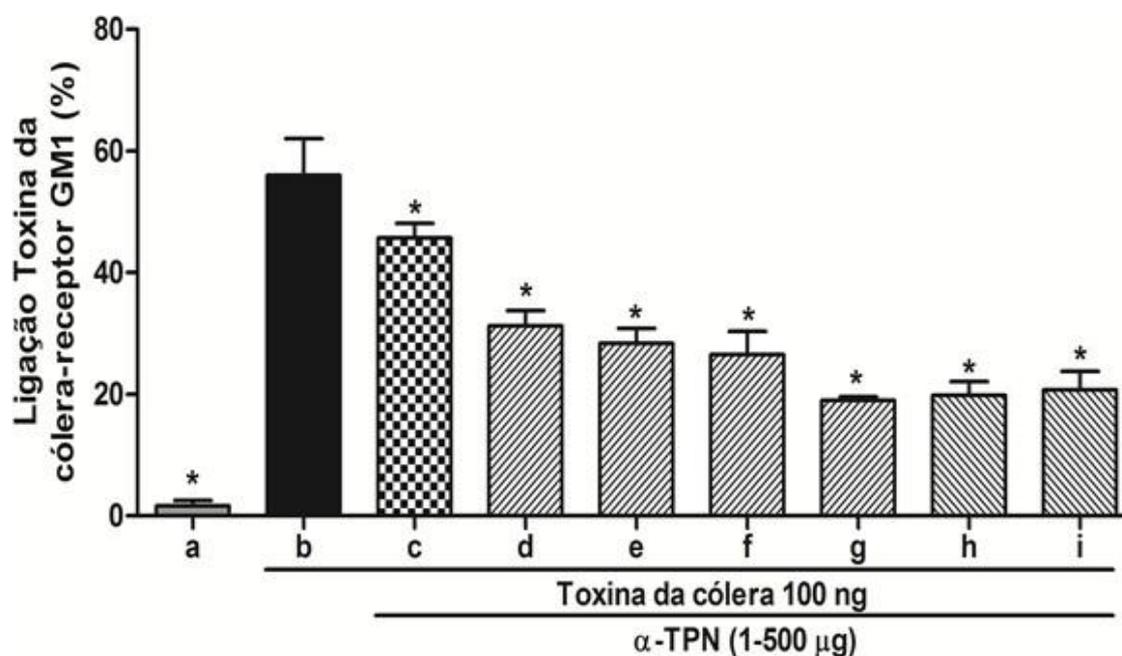


Legenda: (A) Fotografia representando alças intestinais isoladas de camundongos dos seguintes grupos, respectivamente: Salina+PBS, Salina+Toxina da Cólera (1 μ g/alça) e α -TPN+Toxina da Cólera (1 μ g/alça); (B) Secreção de Fluidos medida pela proporção do peso em relação ao comprimento após 4 horas do processo cirúrgico. (C) Concentração de íons cloreto no conteúdo intestinal de alças isoladas de camundongos. (D) Absorção de fluido em alças intestinais isoladas de camundongos divididos em grupos que receberam PBS, α -TPN (12,5 mg/kg), ou glicose (10 mM) como controle positivo. Obs.: a absorção de fluido percentual foi calculada a partir da diferença entre a razão peso/comprimento das alças na presença e ausência de líquidos. Os resultados são expressos como média \pm EPM de um mínimo de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo Toxina e Glicose. Análise estatística: ANOVA e teste Tukey.

4.9 Avaliação da interação toxina-receptor e α -TPN pelo ensaio ELISA-GM1

Para examinar a possível interação entre a toxina, o controle negativo foi representado por poços sem GM1 (coluna A) e os poços revestidos com GM1 foram incubados com 100 ng de CT aos poços (coluna B). Em seguida na presença de GM1, os resultados mostraram que a pré-incubação com GM1 e α -TPN (100 μ g/mL) reduziu a detecção por ELISA da toxina, sugerindo que o α -TPN pode interagir com o receptor GM1 (coluna C). Além disso, quando a toxina (100 ng/mL) e concentrações crescentes de α -TPN (1-500 μ g/mL – colunas D até I) foram adicionadas simultaneamente à placa de microtitulação previamente adsorvida ao GM1, a detecção por ELISA entre GM1-toxina diminuiu significativamente em todas as concentrações. Tomados em conjunto, estes resultados sugerem que o α -TPN pode interagir com o receptor GM1 e com a toxina da cólera (Figura 22).

Figura 22: Efeito do α -TPN sobre a ligação da toxina da cólera (CT) ao receptor GM1



Legenda: Efeitos do α -TPN na Toxina da Cólera (CT) e no GM1. O controle negativo é representado por poços sem GM1 (coluna A). CT (100 ng) foi incubada isolada (coluna B). Os poços revestidos com GM1 foram pré-incubados com α -TPN e lavados, e em seguida foram adicionados 100 ng de CT aos poços e a quantidade de CT foi estimada por ELISA (coluna C). Poços revestidos com GM1 foram incubados com CT e α -TPN nas concentrações 1, 10, 50, 100, 300 ou 500 μ g/mL (colunas D-I, respectivamente). Os dados apresentados são médias \pm EPM de três testes independentes realizadas em condições semelhantes. * $p < 0,05$ vs. Coluna B.

Discussão

5 DISCUSSÃO

No presente estudo investigou-se a atividade antidiarreica do α -TPN em modelos experimentais de diarreia, uma patologia referenciada na literatura como uma das principais causas de morte em crianças menores que cinco anos de idade em todo o mundo, sobretudo nos países em desenvolvimento. Essa patologia resulta em cerca de meio milhão de óbitos por ano, ocupando o segundo lugar entre todas as causas de morte (SAM DAN et al., 2018). Com base nessa premissa, a população busca como alternativa, o uso de plantas medicinais ou produtos advindos destas para o tratamento das doenças diarreicas.

Vários estudos investigaram os efeitos de algumas espécies de plantas sobre a função intestinal, como *Psidium guajava* L. (goiaba) e *Punica granatum* L. (romã), e provaram que esses produtos naturais podem ser uma fonte abundante de compostos biologicamente ativos. Os extratos e os produtos de plantas podem ter efeitos antiespasmódicos, reduzir o trânsito intestinal, suprimir a motilidade intestinal ou diminuir a secreção eletrolítica. Para determinar a atividade antidiarreica de um extrato ou substância isolada, as diarreias são induzidas por um agente, como o óleo de rícino, prostaglandina E₂ ou toxina da cólera em roedores. Como esses agentes possuem diferentes mecanismos de ação, a natureza da atividade antidiarreica pode ser determinada (PALOMBO, 2006; QNAIS et al., 2007; CECÍLIO et al., 2012; RAWAT; SINGH; KUMAR, 2017; RICARDO et al., 2018).

O presente estudo comprovou que o α -Terpineol (α -TPN) possui atividade antidiarreica em roedores, evidenciado em modelos experimentais de diarreia aguda induzida com óleo de rícino ou PGE₂ em camundongos, bem como no modelo de diarreia secretória induzida pela toxina da cólera e no trânsito gastrintestinal, mostrando sua eficácia sobre mecanismos fisiopatológicos relacionados às doenças diarreicas, além de ter demonstrado resultados semelhantes a outros terpenos, como do 1,8-cineol (JALILZADEH-AMIN; MAHAM, 2015) nos mesmos modelos apresentados nesta dissertação. Os resultados obtidos corroboram com estudos anteriores realizados com extratos de plantas utilizadas pela população para tratar diarreia e que possuem em sua composição o α -TPN, como a *Punica granatum* L., (AKTER; SARKER; HOSSAIN, 2013), *Mangifera indica* L. (SAIRAM et al., 2003; EDIRIWEERA; TENNEKOON; SAMARAKOON, 2017), *Calotropis gigantea* L.

(RAHMAN et al., 2012; SINGH; JAVED, 2013), que demonstraram atividade antidiarreica, e o óleo essencial de *Satureja hortensis* L. que apresentou atividade espasmolítica (HAJHASHEMI et al., 2000; LAMPRONTI; SAAB; GAMBARI, 2006).

Estudos para avaliar a toxicidade do α -TPN foram realizados pelas vias intraperitoneal, intramuscular e via oral em roedores. Os animais que receberam α -TPN pela via intraperitoneal foram observados durante 72 horas e verificou-se que a dose letal obtida para 50% dos ratos foi de 847 mg/kg. Pela via intramuscular, os camundongos foram avaliados durante 48 horas e a DL_{50} obtida foi de 2000 mg/kg e, por via oral, estes observados durante 7 dias, a DL_{50} foi de 2900 mg/kg (YAMAHARA et al., 1985; BHATIA; LETIZIA; API, 2008). Assim, levando-se em consideração os valores das doses letais do α -TPN e as doses utilizadas na presente pesquisa (6,25; 12,5; 25; 50 mg/kg), estas são bem menores demonstrando confiabilidade e segurança na pesquisa.

Inicialmente, foram realizados experimentos para modelo de diarreia induzida por óleo de rícino para determinar o efeito antidiarreico do α -TPN. O óleo de rícino possui como composto majoritário o ácido ricinoleico (cerca de 90%) e ácido oleico e linoleico em menores quantidades. Quando ingerido, o óleo é hidrolisado a glicerol e ácido ricinoleico pelas lipases pancreáticas, sendo este último o responsável pelo efeito diarreico (WATSON; GORDON JR., 1962; YOSHIO et al., 1999). Este modelo possui grande reprodutibilidade no número de evacuações de fezes líquidas e formadas, desde que reduz a absorção e aumenta a secreção de água e eletrólitos, além de estimular o peristaltismo, acelerando o trânsito intestinal (MASCOLO et al., 1993).

A presença de ácido ricinoleico no intestino delgado resulta em liberação de prostaglandinas e PAF (Fator Ativador de Plaquetas) (MASCOLO et al., 1994), que promovem vasodilatação, contração da musculatura lisa e secreção de muco no intestino delgado, resultando em um quadro diarreico (KASE et al., 1999; BELLO; MAIHA; ANUKA, 2016). Além disto, o ácido ricinoleico promove a liberação de Óxido nítrico (NO) e ativação da adenilil ciclase com consequente aumento na concentração de AMPc, estimulando a atividade peristáltica no intestino, que por sua vez, altera a permeabilidade da membrana e reduz a atividade da bomba de $Na^+K^+ATPase$, diminuindo assim, a absorção de Na^+ e K^+ , provocando acúmulo

destes eletrólitos e água no lúmen intestinal (GAGINELLA; PHILLIPS, 1975; IZZO; MASCOLO et al., 1994; RAWAT; SINGH; KUMAR, 2017).

Os resultados obtidos nesse estudo demonstram que todas as doses testadas de α -TPN (6,25; 12,5; 25; 50 mg/kg) reduziram significativamente o número total de fezes e de fezes diarreicas, inibindo a defecação e a diarreia induzida pelo óleo de rícino, sugerindo que o α -TPN é capaz de inibir alguns fatores envolvidos no aumento da motilidade intestinal e alterações na permeabilidade da membrana. Os valores apresentados foram bem próximos aos encontrados no estudo de Rahman et al. (2015) que utilizou o mesmo modelo para avaliar a atividade antidiarreica do extrato metanólico da *Maranta arundinacea* Linn. O monoterpeneo em estudo não apresentou resultados significativos nos escores de severidade diarreica, isto pode ser explicado pelo fato deste parâmetro ter uma análise subjetiva. Utilizando o mesmo modelo para *Anacardium occidentale* L, foi possível observar também que apenas a dose intermediária reduziu o escore de severidade, por meio da observação da sujidade perianal (ARAÚJO et al., 2015).

A fim de elucidar os possíveis mecanismos envolvidos na atividade antidiarreica do α -TPN, o efeito anti-secretor foi estudado realizando o teste de *enteropooling*, que avalia a geração de fluidos intestinais pela ação das prostaglandinas (ROBERT et al., 1976). O α -TPN foi capaz de reduzir significativamente a produção de fluidos intestinais em todas as doses testadas. Este efeito pode ser devido à capacidade em aumentar a reabsorção de eletrólitos e água, associado a algum mecanismo antissecretório, como observado no estudo envolvendo o extrato aquoso da *Punica granatum* L., que possui α -TPN na sua composição (QNAIS et al., 2007) e da pesquisa com o monoterpeneo 1,8-cineol (JALILZADEH-AMIN; MAHAM, 2015), em que ambos utilizaram o modelo de *enteropooling* e foi observada redução de geração de fluidos em todas as doses testadas, corroborando com os resultados apresentados neste estudo.

Durante a avaliação da diarreia induzida por óleo de rícino e no *enteropooling* foi possível observar o fenômeno de hormese, definida como uma relação dose-resposta caracterizada em forma de U ou U invertida (U-shaped), em que há uma resposta estimuladora em doses baixas, mas uma resposta inibitória em doses altas (CALABRESE; BALDWIN, 2001a). Avaliando vários sistemas de receptores

farmacológicos que afetam respostas fisiológicas, essencialmente todos exibem respostas bifásicas. Em muitos casos, os sistemas farmacológicos desenvolveram estratégias altamente eficientes nas quais o mesmo agonista endógeno pode provocar uma resposta estimulante ou inibitória dependendo da sua concentração, e assim é possível avaliar os riscos de toxicidade (CALABRESE; BALDWIN, 2001b). Esses resultados do α -TPN corroboram com respostas de outros estudos que utilizaram o mesmo modelo como a atividade antidiarreica de *Anacardium occidentale* L., que apresentou uma relação dose-resposta U-shaped (ARAÚJO, et al, 2015) e em pesquisas com monoterpenos como o (-)-Linalool livre e incorporado no complexo de inclusão contendo β -ciclodextrina (LIN- β CD) que também apresentou esse padrão de resposta em modelos de úlcera gástrica induzida por etanol (SILVA et al., 2016). Considerando os resultados obtidos nestes testes, foi adotada a dose de 12,5 mg/kg como dose padrão para os demais experimentos.

O trânsito gastrintestinal foi avaliado para analisar outro possível mecanismo envolvido na resposta antidiarreica e assim compreender a ação do α -TPN na motilidade intestinal, utilizando carvão ativado (agente não absorvível) como marcador da distância percorrida no intestino. O resultado demonstrou que o α -TPN é capaz de reduzir significativamente o trânsito gastrintestinal, quando comparado a loperamida que é a droga padrão utilizada, sugerindo que seu mecanismo de ação envolva a redução da motilidade intestinal. A loperamida, conhecida como agente antidiarreico é agonista de receptores opioides, atuando sobre os receptores μ -opioides no plexo mioentérico, que por sua vez diminui o tônus da musculatura lisa da parede intestinal. Além disso, promove ativação dos receptores opioides pré-sinápticos presentes no sistema nervoso entérico e com isso, inibe a liberação de acetilcolina, diminuindo o peristaltismo, e assim aumenta o tempo do trânsito intestinal (BELLO; MAIHA; ANUKA, 2016).

Mesmo com resultados similares à loperamida, é necessário avaliar se o α -TPN tem relação com a via opioide, então foi avaliado o trânsito intestinal modulado com naloxona, que é um antagonista de receptor opioide, não seletivo e de curta ação (VAN DORP; YASSEN; DAHAN, 2007). Foi então observado que a naloxona reduziu significativamente o efeito da loperamida, entretanto não foi capaz de antagonizar o efeito exercido pelo α -TPN, sugerindo que sua atividade antidiarreica não depende de mecanismo opioide na redução do trânsito intestinal, o que pode

ser considerado vantajoso, pois exclui os efeitos colaterais oriundos da ação agonista opioide. Entre os efeitos colaterais mais comuns relacionados ao impacto na motilidade intestinal, observa-se dor abdominal, náuseas, vômito, distensão, inchaço e constipação (HANAUER, 2008).

A acetilcolina (ACh) é liberada pelo sistema nervoso parassimpático e desempenha um importante papel fisiológico na regulação dos movimentos intestinais, pois aumenta o influxo de cálcio, promovendo contração da musculatura lisa, assim a inibição deste neurotransmissor pode retardar o trânsito intestinal (GILANI et al., 1997). Deste modo, foi investigado um possível efeito anticolinérgico do α -TPN através do trânsito modulado pela via colinérgica. O indutor utilizado foi o betanecol, um agonista colinérgico que atua nos receptores muscarínicos do tipo M₃, com ampla localização no trato gastrointestinal (INCE; TURKMEN; YAVUZ, 2011).

Neste estudo, pode-se observar que o α -TPN reduziu significativamente os efeitos estimulatórios promovidos pelo betanecol, resultando na redução do trânsito intestinal. Este fato mostra que o α -TPN pode estar competindo diretamente pelos receptores M₃ do TGI, atuando como um antagonista dos receptores muscarínicos, de modo semelhante à atropina, um antagonista colinérgico utilizado como referência que age como antidiarreico diminuindo a motilidade e aumentando o tempo de trânsito intestinal (BROADLEY; KELLY, 2001). É válido ressaltar que o modelo de trânsito intestinal é um indicador da distância percorrida pelo marcador (carvão ativado) ao longo do intestino delgado, mas não fornece informações se o efeito promovido é devido um esvaziamento no estômago ou relacionado a alteração no trânsito intestinal. Estudos anteriores, realizados por Silva e colaboradores (2016), utilizando o α -TPN em testes de esvaziamento gástrico comprovam que em altas doses, o α -TPN é retido no estômago devido à atividade muscarínica, corroborando com os resultados apresentados no presente estudo. Porém, em doses baixas o α -TPN não possui efeito sobre a retenção gástrica (SILVA et al., 2016), sugerindo que na melhor dose utilizada neste estudo (12,5 mg/kg), o α -TPN pode ter ação na motilidade apenas a nível intestinal.

Outro modelo que pode ser utilizado para avaliar a atividade antidiarreica é a indução do processo diarreico pela prostaglandina E₂ (PGE₂) que promove diarreia

inflamatória (MUKHERJEE et al., 1998). A prostaglandina E_2 é um metabólito pró-inflamatório, resultado do metabolismo da ciclooxigenase II e pode exercer uma variedade de ações fisiológicas, como migração de leucócitos, ativação de moléculas pró-inflamatórias e angiogênese ao se ligarem aos seus receptores específicos (EP_1 , EP_2 , EP_3 e EP_4) acoplados à proteína G (SUGITA et al., 2013). A PGE_2 pode atuar alterando a motilidade intestinal através da interação com receptores EP_3 presentes no músculo liso intestinal, promovendo contrações da musculatura lisa, além de atrair água e eletrólitos para o lúmen intestinal (AWOUTERS et al., 1978; SHAHBAZIAN et al., 2002).

Os resultados obtidos com a análise do *enteropooling* induzido pela PGE_2 mostraram que o α -TPN foi capaz de reduzir significativamente a geração de fluidos neste ensaio. Esta redução pode estar relacionada a um mecanismo citoprotetor, bloqueando receptores EP, o que impede a ligação de prostaglandinas no trato gastrointestinal. Este efeito corrobora com estudos anteriores em que o α -TPN evidenciou propriedades anti-inflamatórias e antinociceptivas em um modelo de hipernocicepção induzida por PGE_2 (OLIVEIRA et al., 2012).

Outro modelo utilizado foi de diarreia induzida pela toxina da cólera para verificar um possível efeito antissecretório do α -TPN. A cólera apresenta-se como uma diarreia secretora aguda causada por uma infecção dos sorotipos O1 e O139 de *Vibrio cholerae* e é uma causa de grandes epidemias em mais de 50 países (HARRIS et al., 2012; DAVIES; BOWMAN; LUBY, 2017). Mesmo com o tratamento da cólera e as melhores condições de qualidade da água, saneamento e higiene, ainda estima-se que aproximadamente 100.000 mortes ocorrem anualmente devido a esta enfermidade (CLEMENS et al., 2017). Alguns sintomas da cólera são diarreia aquosa, vômitos e se não houver um tratamento adequado, o paciente pode desidratar-se, sofrendo de acidose e colapso circulatório, situação que pode levar a morte (LEMOS-PAIÃO; SILVA; TORRES, 2017).

O principal fator de virulência que ocasiona a perda de fluido intestinal durante a cólera é a liberação de uma toxina secretada pelo *V. cholerae* no intestino delgado (BASU; MUKHOPADHYAY, 2014). A toxina da cólera (CT) é composta por dois tipos de subunidades, a maior subunidade A está localizada centralmente acoplada à subunidade B que contém cinco peptídeos idênticos dispostos em um anel

pentamérico localizados periféricamente. Ao ser liberada da bactéria, a CT liga-se a enterócitos intestinais por meio da interação da subunidade B com o receptor de gangliosídeo GM1, e é então internalizada por endocitose. Dentro da célula, a subunidade A conduz à ribosilação de ADP da proteína G α e à ativação constitutiva de adenilil ciclase, ocasionando assim níveis aumentados de AMP cíclico dentro da célula hospedeira. Como resultado, há ativação da proteína quinase A (PKA) e consequente abertura de canais para Cl⁻ (CFTR) na membrana apical de enterócitos, além da inibição da absorção de Na⁺, desencadeando um desequilíbrio eletrolítico e promovendo os sinais clínicos da cólera (THIAGARAJAH; VERKMAN, 2005; BHARATI; GANGULY, 2011).

Este estudo mostrou que o α -TPN tem eficácia antidiarreica em modelo de diarreia induzida pela toxina da cólera, reduzindo significativamente o acúmulo de fluido intestinal nas alças isoladas e a perda de íons cloreto extracelulares (Cl⁻). Resultados semelhantes foram relatados em estudo com o polissacarídeo sulfatado extraído da alga marinha vermelha *Hypnea musciformis* (Wulfen) (SOUSA et al., 2016), fração polissacarídica sulfatada da alga *Gracilaria intermedia* J.Agardh. (LEÓDIDO et al., 2017), Sulfeto de hidrogênio (SOUSA et al., 2017) e látex de *Plumeria pudica* Jacq. (SANTANTA et al., 2018), tornando assim o α -TPN um possível candidato à fármaco no tratamento de diarreia induzida por CT, visto que as possibilidades terapêuticas para a patologia são restritas.

A antibioticoterapia é frequentemente utilizada contra infecções por *V. cholerae*, no entanto, o surgimento de resistência deste micro-organismo aos agentes quimioterápicos é um grave problema clínico (SAHA; DAS; CHAUDHURI, 2013). É utilizado também no tratamento da cólera, a reposição de água e de eletrólitos, por meio da administração de solução de reidratação oral (SRO). Ainda que esta solução seja eficaz para a hidratação e reduza a mortalidade, a SRO não inibe a secreção excessiva mediada pela toxina da cólera nem elimina a infecção da *V. cholerae* (BINDER et al., 2014).

A absorção de água e íons é o resultado de dois fluxos unidirecionais opostos de íons, um absorptivo e outro secretor, que ocorrem anatomicamente separados. Normalmente, os processos de absorção de água e eletrólitos prevalecem sobre os processos secretórios e, como resultado, a água é absorvida. No entanto, durante a

doença diarreica, há um desarranjo nos processos de absorção-secreção por mecanismos osmóticos e/ou secretórios. Assim, a terapia de reidratação oral contém glicose, na qual a sua via clássica de absorção é predominantemente mediada pelo transportador SGLT1, uma proteína de membrana que acopla duas moléculas de Na^+ juntamente com uma molécula de glicose, aumentando a reabsorção de fluidos (SUH; HAHN; CHO, 2010; QIN et al., 2018).

Foi então investigado o envolvimento do α -TPN sobre o processo normal de absorção intestinal, e foi observado que não demonstrou diferença significativa da glicose. Isto demonstra que não houve interferência sobre este parâmetro, indicando que sua atuação pode promover a reabsorção de fluidos, e conseqüentemente de água, diminuindo assim a desidratação promovida pela diarreia secretória. Além disso, por ser um monoterpeneo e é uma molécula pequena, provavelmente o α -TPN tenha sido absorvido juntamente com o fluido, e conseqüentemente pode ter uma ação intracelular.

Como um possível mecanismo, pode-se sugerir que possa atuar inibindo o canal CFTR e, portanto poderia diminuir a secreção de Cl^- , já que o presente estudo demonstrou que o α -TPN reduz a perda de íons cloreto extracelulares. Além disso, diante de uma ação intracelular, o α -TPN pode interagir com o receptor SGLT1, explicando assim a absorção de fluidos observada anteriormente. Desta forma, o monoterpeneo pode atuar das duas formas, aumentando a reabsorção de líquido e eletrólitos, e impedindo a secreção de Cl^- , fatores que podem impulsionar novos estudos a cerca desta biomolécula para identificar as suas vias de atuação e promover o desenvolvimento de fármacos para o tratamento da cólera.

A toxina da cólera promove seus efeitos a partir da ligação ao receptor GM1, que apresenta uma porção externa formada por carboidratos e uma porção interna por lipídio ceramida, presentes na membrana dos enterócitos. Quando ocorre a ligação toxina-receptor, há a internalização do complexo por endocitose, sendo transportado através da via retrógrada por meio do complexo de Golgi para o retículo endoplasmático, onde as subunidades A e B se dissociam. A subunidade CT-A1 promove citotoxicidade e catalisa a ribosilação de ADP do componente trimérico Gsa por meio dos fatores de ribosilação (ARFs). Após a ADP-ribosilação por CT, a AC (Adenilil ciclase) permanece no estado ligado ao GTP, aumentando

sua atividade e conseqüentemente elevando a concentração de AMPc intracelular que promove uma diminuição na absorção de sódio e aumento da perda de cloretos, mediada pelo CFTR e resultando em perda de água das células no lúmen do intestino (THIAGARAJAH; VERKMAN, 2012; AURELI, 2015; JOBLING, 2015).

Além da possibilidade que o α -TPN tenha entrado nos enterócitos para interferir na via de ativação da CT intracelular, a molécula estudada foi hipotetizada interagindo com o receptor GM1 e os resultados mostram que o α -TPN tem atuação no receptor GM1, sugerindo que α -TPN pode de alguma forma interagir com o sítio de ligação ao receptor e impedir a ligação CT-GM1, que é um indicativo que o α -TPN pode ser um possível antagonista dos receptores GM1, resultado semelhante ao estudo realizado com a goma do cajueiro, extraído do *Anacardium occidentale* L. (ARAÚJO et al., 2015; COSTA et al., 2016; SOUSA et al., 2016; LEÓDIDO et al., 2017). Além disso, como a molécula pode ter ações intracelulares, o α -TPN pode ter afinidade pela região intracelular do receptor GM1.

A porção funcionalmente ativa da toxina da cólera é um heterodímero da subunidade A1 da holotoxina *Vibrio cholerae* e do fator 6 de ribosilação ADP (ARF6) do citoplasma do hospedeiro humano, que é responsável pela ribosilação de ADP e provoca perda de água e eletrólitos das células hospedeiras (KAPER et al., 1995). Essa região da subunidade A1 é um possível local de interação entre drogas e toxina, impedindo a ligação entre a toxina e o receptor, o que resultaria na inativação da toxina e conseqüentemente o não surgimento da fisiopatologia da cólera. Existem muitas substâncias que promovem essa mudança na conformação da toxina, como compostos com resíduos de carbonila, moléculas sulfatadas e nitrogenadas, alcaloides, guanidinas, entre outros compostos, que exibem alta afinidade de ligação à subunidade A1-ARF6 (GANGOPADHYAY; DATTA, 2015; CLEMENS et al., 2017). Este é um dos possíveis mecanismos de ação do α -TPN sobre a diarreia induzida pela toxina da cólera.

Diante do exposto, observa-se que o α -TPN pode ser utilizado como ferramenta importante na elaboração de novas substâncias, pois apresentou grande potencial antidiarreico em modelos de diarreia aguda em roedores (Diarreia induzida por óleo de rícino), diarreia inflamatória (modelo de indução por PGE₂) e diarreia secretora (modelo induzido pela toxina da cólera), resultante da sua capacidade em

inibir a motilidade intestinal, por meio de mecanismos anticolinérgicos, e conseqüentemente, evitar o acúmulo de fluido intestinal e reduzir a secreção de água e cloretos para o lúmen intestinal. O α -TPN também demonstrou significativa atividade antissecretória, que pode ser explicada, pela diminuição da liberação de eletrólitos e aumento da reabsorção de fluido intestinal. Provavelmente, o monoterpeno também tenha sido absorvido juntamente ao fluido intestinal e exercer uma ação intracelular bloqueando canais e transportadores. Além disso, apresentou capacidade de interação com receptores GM1 e/ou com a própria toxina, assim, futuramente com novos estudos para elucidar estes mecanismos, pode vir a ser utilizado como fármaco para o tratamento da diarreia.

Conclusões

6 CONCLUSÕES

- O α -Terpineol apresenta atividade antidiarreica em modelo de diarreia e *enteropooling* induzido por óleo de rícino, reduzindo a produção de fluidos intestinais.
- A atividade antidiarreica do α -TPN é devido a sua ação sobre o trânsito gastrointestinal, associada a um possível bloqueio de receptores colinérgicos, promovendo redução da motilidade intestinal, de acúmulo de fluidos intestinais e redução da secreção de íons e água para o lúmen intestinal.
- O α -TPN demonstrou eficácia na diarreia inflamatória pela inibição do *enteropooling* induzido por PGE₂.
- O α -TPN apresentou atividade antissecretória em modelo de diarreia induzida pela toxina da cólera (TC) em alça intestinal isolada de camundongos, inibindo a perda de água e íons cloretos (Cl⁻) a partir dos enterócitos para o lúmen intestinal.
- O α -TPN evidenciou efeito no processo normal de absorção intestinal em alças isoladas de camundongos, promovendo o aumento da reabsorção de fluidos intestinais.
- Através de ensaio de ELISA foi comprovado que o α -TPN tem a capacidade de interagir com receptores GM1 e/ou com a toxina da cólera, prevenindo a ligação CT-receptor GM1.

Perspectivas

7 PERSPECTIVAS

- Verificar a atividade de $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ a partir da indução a diarreia pelo óleo de rícino em camundongos;
- Investigar a atividade antidiarreica do α -TPN em modelos de diarreia induzida por sulfato de magnésio;
- Examinar a participação de outros receptores, como serotoninérgicos, α -adrenérgicos, TRP's, de canais de cálcio e de potássio, a partir de modulação do trânsito gastrintestinal;
- Ampliar os estudos computacionais, realizando docagem, para melhor elucidar o mecanismo de ação envolvendo o α -TPN, através da análise dos receptores colinérgico, EP_3 , GM1 ;
- Averiguar o mecanismo pelo qual o α -TPN pode ser absorvido e como teria ação intracelular por meio de microscopia confocal;
- Investigar uma possível interação do α -TPN com o canal CFTR;
- Verificar se o α -TPN apresenta atividade antimicrobiana.

NEGREIROS, P. S. Eficácia do monoterpeneo α -terpineol na atividade antidiarreica em roedores. 2018. PPGFARM/NPPM/CCS/UFPI

REFERÊNCIAS

ADENIYI, O. S. et al. Antidiarrheal activity of hexane extract of *Citrus limon* peel in an experimental animal model. **Journal of Integrative Medicine**, v. 15, n. 2, p. 158-164, 2017.

AGRA, M. F. et al. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 3, p. 472-508, 2008.

AKTER, S.; SARKER, A.; HOSSAIN, S. Antidiarrhoeal activity of rind of *Punica granatum*. **International Current Pharmaceutical Journal**, v. 2, n. 5, p. 101-104, 2013.

ARAÚJO, T. S. L. et al. Antidiarrheal activity of cashew GUM, a complex heteropolysaccharide extracted from exudate of *Anacardium occidentale* L. in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 174, p. 299-307, 2015.

ATIA, A. N.; BUCHMAN, A. Oral Rehydration Solutions in Non-Cholera Diarrhea: A Review. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 104, p. 2596–2604, 2009.

AURELI, M. GM1 Ganglioside: Past Studies and Future Potential. **Molecular Neurobiology**, v.53, n. 3, p 1824–1842, 2015.

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

BAKER, D. E. Loperamide: a pharmacological review. **Reviews in Gastroenterological Disorders**, v. 7, n. 3, p. S11 – S18, 2007.

BARES, L. M. M. et al. Gammagrafía con ^{75}SeH CAT en la diarrea crónica por malabsorción de ácidos biliares. **Revista Española de Medicina Nuclear e Imagen Molecular**, v. 36, n. 1, p. 37-47, 2017.

BARRETT, J; BROWN, M. Diarrhoea in travellers. **Medicine**, v. 46, n. 1, p. 24-29, 2018.

NEGREIROS, P. S. Eficácia do monoterpeneo α -terpineol na atividade antidiarreica em roedores. 2018. PPGFARM/NPPM/CCS/UFPI

BASU I; MUKHOPADHYAY, C. Insights into binding of cholera toxin to GM1 containing membrane. **Langmuir**, v. 30, n. 50, p. 15244–15252, 2014.

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, n. 22, p. 13-21, 2016.

BHARATI, K.; GANGULY, N. K. Cholera toxin: A paradigm of a multifunctional protein. **Indian Journal of Medical Research**, v. 133, n. 2, p. 179–187, 2011.

BHATIA, S. P.; LETIZIA, C. S.; API, A. M. Fragrance material review on alpha-terpineol. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 11, p. S280-S285, 2008.

BHUTTA, Z; SYED, S. Diarrheal Diseases. **Encyclopedia of Food and Health**, p. 361-372, 2016.

BICAS, J. L. et al. Optimization of R-(+)- α -terpineol production by the biotransformation of R-(+)-limonene. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 35, n. 9, p. 1061–1070, 2008.

BINDER, H. J. et al. Oral Rehydration Therapy in the Second Decade of the Twenty-first Century. **Current Gastroenterology Reports**, v. 376, p. 1-8, 2014.

BIRDI, T. et al. Newer insights into the mechanism of action of *Psidium guajava* L. leaves in infectious diarrhoea. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 10, n. 33, p.1-11, 2010.

BRANDT, K. G.; ANTUNES, M. M. C.; SILVA, G. A. P. Acute diarrhea: evidence-based management. **Jornal de Pediatria**, v. 91, n. 6, p. S36-S43, 2015.

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 18 de fevereiro de 2018.

BROADLEY, K. J.; KELLY, D. R. Muscarinic Receptor Agonists and Antagonists. **Molecules**, v. 6, n. 3, p. 142-193, 2001.

NEGREIROS, P. S. Eficácia do monoterpeno α -terpineol na atividade antidiarreica em roedores. 2018. PPGFARM/NPPM/CCS/UFPI

CALABRESE, E. J.; BALDWIN, L. A. The frequency of U-shaped dose responses in the toxicological literature. **Toxicological Sciences**, v. 62, n. 2, p. 330-338, 2001a.

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

CAMILLERI, M.; SELLIN, J. H.; BARRETT, K. E. Pathophysiology, Evaluation, and Management of Chronic Watery Diarrhea. **Gastroenterology**, v. 152, n. 3, p. 515-532; 2017.

CARVALHO, C. C. R.; FONSECA, M. M. R. Biotransformation of terpenes. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 2, p. 134-142, 2006.

CECÍLIO, A. B. et al. Screening of Brazilian medicinal plants for antiviral activity against rotavirus. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 141, n. 3, p. 975-981, 2012.

CLEMENS, J. D. et al. Cholera. **The Lancet**, v. 390, n. 10101, p. 1539-1549, 2017.

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.

CUNHA, A.A. **Avaliação de parâmetros inflamatórios e de estresse oxidativo em modelo experimental de hiper – homocisteinemia severa**. 2012. 205f. Dissertação (Doutorado em ciências biológicas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

DANTAS, R. O. Diarreia e Constipação Intestinal. **Medicina**, v. 37, p. 262-266, 2004.

DAVIES, H. G.; BOWMAN, C.; LUBY, S. P. Cholera – management and prevention. **Journal of Infection**, v. 74, n. 1, p. S66-S73, 2017.

DICARLO, G. D. et al. Effects of quercetin on gastrointestinal tract in rats and mice. **Phytotherapy research**, v. 8, n. 1, p. 42-44, 1994.

DRANCOURT, M. Acute Diarrhea. In: COHEN, J.; POWDERLY, W. G.; OPAL, S. M. **Infectious Diseases**. 4ª ed. [S.l.]: Elsevier, 2017, p. 335–340.

NEGREIROS, P. S. Eficácia do monoterpeneo α -terpineol na atividade antidiarreica em roedores. 2018. PPGFARM/NPPM/CCS/UFPI

DUTRA, R. C. et al. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4-29, 2016.

EDIRIWEERA, M. K.; TENNEKOON, K. H.; SAMARAKOON, S. R. A Review on Ethnopharmacological Applications, Pharmacological Activities, and Bioactive Compounds of *Mangifera indica* (Mango). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, p. 1-24, 2017.

FAURE, C. Role of Antidiarrhoeal Drugs as Adjunctive Therapies for Acute Diarrhoea in Children. **International Journal of Pediatrics**, v. 2013, 2013.

FERNANDES, Hélio de Barros. **Preparação de nanopartículas contendo α -terpineol e seus efeitos sobre lesões gástricas em roedores**. 2016. 86 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia – RENORBIO) – Universidade Federal do Piauí – UFPI, Teresina.

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

FONSECA, A. M. et al. Introdução a estudos etnobotânicos: um breve ensaio interdisciplinar em Amargosa – BA. **Revista Magistra**, v.24, n. 1, p. 42-54, 2012.

GAGINELLA, T. S.; PHILLIPS, S. F. Ricinoleic Acid: Current View of an Ancient Oil. **Digestive Diseases**, v. 20, n. 12, p. 1171-1177, 1975.

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.

GANGOPADHYAY, A.; DATTA, A. Identification of inhibitors against the potential ligandable sites in the active cholera toxin. **Computational Biology and Chemistry**, v. 55, p. 37-48, 2015.

GBD - Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. **The Lancet**, v. 388, n. 10053, p. 1459-1544, 2016.

NEGREIROS, P. S. Eficácia do monoterpeneo α -terpineol na atividade antidiarreica em roedores. 2018. PPGFARM/NPPM/CCS/UFPI

GBD - Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age–sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **The Lancet**, v. 385, n. 9963, p117–171, 2015.

GILANI, A. H. et al. Interaction of ebeinone, an alkaloid from *Fritillaria imperialis*, at two muscarinic acetylcholine receptor subtypes. **Life Sciences**, v. 60, n. 8, p. 535-544, 1997.

GODEL, J. Treatment of diarrheal disease. **Paediatrics & Child Health**, v. 8, n. 7, p. 455–458, 2003.

GONÇALVES, J. L. S. et al. In vitro anti-rotavirus activity of some medicinal plants used in Brazil against diarrhea. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, n. 3, p. 403-407, 2005.

GRIMWOOD, K.; FORBES, D. A. Acute and Persistent Diarrhea. **Pediatric Clinics of North America**, v. 56, n. 6, p. 1343-1361, 2009.

GUARINO, A.; VECCHIO, A. L.; CANANI, R. B. Chronic diarrhoea in children. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 26, n. 5, p. 649-661, 2012.

HAJHASHEMI, V. et al. Antispasmodic and anti-diarrhoeal effect of *Satureja hortensis* L. essential oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, n. 1–2, p. 187-192, 2000.

HANAUER, S. B. The role of loperamide in gastrointestinal disorders. **Reviews in Gastroenterological Disorders**, v. 8, n. 1, p. 15-20, 2008.

HARRIS, J. B. et al. Cholera. **The Lancet**, v.379, n. 9835, p. 246-2476, 2012.

HASSAN, S. B. et al. Alpha terpineol: a potential anticancer agent which acts through suppressing NF-kappaB signalling. **Anticancer Research**, v. 30, n. 6, p. 1911-1919, 2010.

HEARN, P.; T. DOHERTY. Diarrhoea in travellers. **Medicine**, v. 42, n. 2, p. 84-88, 2014.

NEGREIROS, P. S. Eficácia do monoterpeneo α -terpineol na atividade antidiarreica em roedores. 2018. PPGFARM/NPPM/CCS/UFPI

HODGES, K.; GILL, R. Infectious diarrhea: Cellular and molecular mechanisms. **Gut Microbes**, v.1, n.1, p. 4-21, 2010.

HOLMGREN, J.; LUNDGREN, A. Diarrhea Caused by Bacteria. In: PLOTKIN, S. A.; ORENSTEIN, W.; OFFIT, P. A. **Plotkin's Vaccines**. 7^a ed. Philadelphia: Elsevier, 2018, p. 252–260.

HORE, S. K. et al. Effect of aqueous *Euphorbia hirta* leaf extract on gastrointestinal motility. **Fitoterapia**, v. 77, n. 1, p. 35-38, 2006.

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.

IRELAND, B. F. et al. Chemical variation in the leaf essential oil of *Melaleuca quinquenervia* (Cav.) S.T. Blake. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, n. 5, p. 457-470, 2002.

IZZO, A. A.; MASCOLO, N.; CAPASSO, F. Nitric oxide as a modulator of intestinal water and electrolyte transport. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 43, n. 8, p. 1605-1620, 1998.

JALILZADEH-AMIN, G.; MAHAM, M. The application of 1,8-cineole, a terpenoid oxide present in medicinal plants, inhibits castor oil-induced diarrhea in rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 4, p. 594–599, 2015.

JOBLING, M. G. et al. A mutational analysis of residues in cholera toxin A1 necessary for interaction with its substrate, the stimulatory G protein Gs α . **Toxins**, v. 7, n. 3, p. 919-935, 2015.

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

KAPER, et al., Cólera. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, n. 1, p. 48-86, 1995.

KASE, S. et al. Relationship between the antidiarrhoeal effects of Hange-Shashin-To and its active components. **Phytotherapy Reserach**, v. 13, n. 6, p. 468-73, 1999.

NEGREIROS, P. S. Eficácia do monoterpeneo α -terpineol na atividade antidiarreica em roedores. 2018. PPGFARM/NPPM/CCS/UFPI

KENT, A. J.; BANKS, M. R. 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. RR16, p. 1-16, 2003.

KIYAMA, R. Estrogenic terpenes and terpenoids: Pathways, functions and applications. **European Journal of Pharmacology**, v. 815, n. 15 p. 405-415, 2017.

KOLLARITSCH, H.; PAULKE-KORINEK, M.; WIEDERMANN, U. Traveler's Diarrhea. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 3, p. 691-706, 2012.

KOTLOFF, K. L. The Burden and Etiology of Diarrheal Illness in Developing Countries. **Pediatric Clinics of North America**, v. 64, n. 4, p. 799-814, 2017.

KOZIOL, A. et al., An overview of the pharmacological properties and potential applications of natural monoterpenes. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 14, p. 1156-68, 2014.

KUMAR, V. S. et al. Spatial mapping of acute diarrheal disease using GIS and estimation of relative risk using empirical Bayes approach. **Clinical Epidemiology and Global Health**, v. 5, n. 2, p. 87–96, 2017.

LAMPRONTI, I; SAAB, A. M.; GAMBARI, R. Antiproliferative activity of essential oils derived from plants belonging to the Magnoliophyta division. **International Journal Of Oncology**, v. 29, n. 4, p. 989-95, 2006.

LEE, K. J. Pharmacologic Agents for Chronic Diarrhea. **Intestinal Research**, v.13, n. 4, p. 306-312, 2015.

LEMOS-PAIÃO, A. P.; SILVA, C. J.; TORRES, D. F. M. An epidemic model for cholera with optimal control treatment. **Journal of Computational and Applied Mathematics**, v. 318, p. 168-180, 2017.

LEÓDIDO, A. C. M. et al. Anti-diarrhoeal therapeutic potential and safety assessment of sulphated polysaccharide fraction from *Gracilaria intermedia* seaweed in mice. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 97, p. 34-45, 2017.

LI, Z.; VAZIRI, H. Treatment of chronic diarrhoea. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 26, n. 5, p. 677-687, 2012.

NEGREIROS, P. S. Eficácia do monoterpeneo α -terpineol na atividade antidiarreica em roedores. 2018. PPGFARM/NPPM/CCS/UFPI

LIM, J. M. et al. Selection of affinity peptides for interference-free detection of cholera toxin. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 99, n. 15, p. 289-295, 2018.

LIMA, P. S. S. et al. Inclusion of terpenes in cyclodextrins: Preparation, characterization and pharmacological approaches. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 965-987, 2016.

LIU, L. et al. Global, regional, and national causes of child mortality in 2000–13, with projections to inform post-2015 priorities: an updated systematic analysis. **The Lancet**, v. 385, n. 9966, p. 430-440, 2015.

LOGAN, A. C.; BEAULNE, T. M. The treatment of small intestinal bacterial overgrowth with enteric-coated peppermint oil: a case report. (Peppermint oil). **Alternative Medicine Review**, v. 7, n. 5, p. 410-417, 2002.

LOGAN, C.; O'LEARY, J. J.; O'SULLIVAN, N. Real-time reverse transcription PCR detection of norovirus, sapovirus and astrovirus as causative agents of acute viral gastroenteritis. **Journal of Virological Methods**, v. 146, n. 1–2, p. 36-44, 2007.

LÓPEZ-HERNÁNDEZ, K. M. et al., Seasonal abundance of *Vibrio cholerae* non O1/non O139 chxA+ in oysters harvested in a coastal lagoon of Mexico's Gulf coast: A seafood safety risk concern. **Food Control**, v. 53, p. 46-54, 2015.

LUNDGREN, O; SVENSSON, L. Pathogenesis of Rotavirus diarrhea. **Microbes and Infection**, v. 3, n. 13, p.1145-1156, 2001.

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.

MASCOLO, N. et al. Nitric oxide and castor oil-induced diarrhea. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 268, n. 1, p. 291-295, 1994.

MAY, A. et al. Biomass production and essential oil of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) in function of the height and interval between the cuts. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 12, n. 2, p. 195-200, 2010.

NEGREIROS, P. S. Eficácia do monoterpeneo α -terpineol na atividade antidiarreica em roedores. 2018. PPGFARM/NPPM/CCS/UFPI

MAWATARI, M.; KATO, Y. Norovirus Gastroenteritis. In: Ergönül, O. et al. **Emerging Infectious Diseases**. [S.l.]: Elsevier, 2014, p. 203-212.

McCLARREN, R. L.; LYNCH, B.; NYAYAPATI, N. Acute Infectious Diarrhea. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, v. 38, n. 3, p. 539-564, 2011.

MESSIAS M. C. T. B. et al. Uso popular de plantas medicinais e perfil socioeconômico dos usuários: um estudo em área urbana em Ouro Preto, MG, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 1, p. 76-104, 2015.

MEWALAL, R. et al. Plant-Derived Terpenes: A Feedstock for Specialty Biofuels. **Trends in Biotechnology**, v. 35, n. 3, p. 227-240, 2017.

MILLER, H., et al. Loperamide misuse and abuse. **Journal of the American Pharmacists Association**, v. 57, n. 2, p. S45-S50, 2017.

MOON, C. et al. Drug-induced secretory diarrhea: A role for CFTR. **Pharmacological Research**, v. 102, p. 107-112, 2015.

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.

MUANGNIL, P. et al. A fungal metabolite zearalenone as a CFTR inhibitor and potential therapy of secretory diarrheas. **Biochemical Pharmacology**, v. 150, p. 293-304, 2018.

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.

NAVOLOTSKAYA, E. V. et al. Binding of cholera toxin B subunit to intestinal epithelial cells. **Toxicology in Vitro**, v. 47, p. 269–273, 2018.

NJUME, C.; GODUKA, N. I. Treatment of Diarrhoea in Rural African Communities: An Overview of Measures to Maximise the Medicinal Potentials of Indigenous Plants. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 9, n. 11, p. 3911-3933, 2012.

NEGREIROS, P. S. Eficácia do monoterpeneo α -terpineol na atividade antidiarreica em roedores. 2018. PPGFARM/NPPM/CCS/UFPI

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.

OLIVEIRA, M. G. B. et al., α -Terpineol, a monoterpene alcohol, complexed with β -cyclodextrin exerts antihyperalgesic effect in animal model for fibromyalgia aided with docking study. **Chemico-Biological Interactions**, v. 254, n. 25, 54-62, 2016.

OLIVEIRA, M. G. B., et al. α -terpineol reduces mechanical hypernociception and inflammatory response. **Basic Clinical Pharmacology Toxicology**, v. 111, n. 2, p. 120-125, 2012.

PACHÚ, C. O. **Processamento de plantas medicinais para obtenção de extratos secos e líquidos**. 2007. 117f. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos) – Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande.

PALOMBO, E. A. Phytochemicals from Traditional Medicinal Plants used in the Treatment of Diarrhoea: Modes of Action and Effects on Intestinal Function. **Phytotherapy Research**, v. 20, n. 9, p. 717-724, 2006.

PATEL, K.; THILLAINAYAGAM, A. V. Diarrhoea. **Medicine**, v. 37, n. 1, p. 23-27, 2009.

PATEL, T. S. et al. Crofelemer for the treatment of chronic diarrhea in patients living with HIV/AIDS. **Dove Press journal: HIV/AIDS - Research and Palliative Care**, v. 5, p. 153-162, 2013.

QIN, C. et al. Effects of dietary glucose and sodium chloride on intestinal glucose absorption of common carp (*Cyprinus carpio* L.), **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 495, n. 2, p. 1948-1955, 2018.

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.

QNAIS, et al. Antidiarrheal activity of *Laurus nobilis* L. leaf extract in rats. **Journal of Medicinal Food**, v. 15, n. 1, p. 51-57, 2012.

QUINTANS-JÚNIOR, L. J. et al. α -Terpineol reduces nociceptive behavior in mice. **Pharmaceutical Biology**, v. 49, n. 6, p. 583-586, 2011.

NEGREIROS, P. S. Eficácia do monoterpeneo α -terpineol na atividade antidiarreica em roedores. 2018. PPGFARM/NPPM/CCS/UFPI

RAHIMI-NASRABADI M. et al. Chemical Composition, Antioxidant, and Antibacterial Activities of the Essential Oil and Methanol Extracts of *Eucalyptus largiflorens* F. Muell. **International Journal of Food Properties**, v. 16, n. 2, p. 369–381, 2013.

RAHMAN, K. et al. Evaluation of Antidiarrheal Activity of Methanolic Extract of *Maranta arundinacea* Linn. Leaves. **Advances in Pharmacological Sciences**, v. 2015, p. 1-6, 2015.

RAHMAN, R. et al. Evaluation of *Calotropis gigantea* root in experimental diarrhea. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.2, n. 1, p. 10-15, 2012.

RAMAN, M. Testing for Chronic Diarrhea. **Advances in Clinical Chemistry**, v.79, p.199-244, 2017.

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

RICARDO, L. M. et al. Evidence of traditionality of Brazilian medicinal plants: the case studies of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (barbatimão) barks and *Copaifera* spp. (copaíba) oleoresin in wound healing. **Journal of Ethnopharmacology**, 2018.

ROBERT, A. et al. Enteropooling Assay: a test for diarrhea produced by prostaglandins. **Prostaglandins**, v. 11, n. 1, p. 809-828, 1976.

ROCHA, M. F. G. Intestinal secretory factor release by macrophages stimulated with *Clostridium difficile* toxin A: role of interleukin 1-beta. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 10, p. 4910–4916, 1998.

ROTTAVA, I. et al. Optimization of α -Terpineol Production by the Biotransformation of R-(+)-Limonene and (-)- β -Pinene. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 164, n. 4, p. 514–523, 2011.

RUIZ, M. C.; COHEN, J.; MICHELANGELI, F. Role of Ca^{2+} in the replication and pathogenesis of rotavirus and other viral infections. **Cell Calcium**, v. 28, n. 3, p. 137-149, 2000.

NEGREIROS, P. S. Eficácia do monoterpeneo α -terpineol na atividade antidiarreica em roedores. 2018. PPGFARM/NPPM/CCS/UFPI

SABINO, C. K. B., et al. Cardiovascular effects induced by α -terpineol in hypertensive rats. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 28, n. 5, p. 333-339, 2013.

SAHA, P.; DAS, B.; CHAUDHURI, K. Role of 6-Gingerol in Reduction of Cholera Toxin Activity *In Vitro* and *In Vivo*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 9, p. 4373-4380, 2013.

SAIRAM, K. et al. Evaluation of anti-diarrhoeal activity in seed extracts of *Mangifera indica*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 84, n. 1, p. 11-15, 2003.

SAMDAN, A. et al. Hospital-based surveillance for rotavirus diarrhea in Ulaanbaatar, Mongolia, April 2009 through March 2016. **Vaccine**, 2018.

SÁNCHEZ, J.; HOLMGREN, J. Cholera toxin – A foe & a friend. **Indian Journal Medical Reserch**, v. 133, n. 2, p. 153-163, 2011.

SANTANTA, L. A. B. et al. Antidiarrheal effects of water-soluble proteins from *Plumeria pudica* latex in mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 97, p. 1147-1154, 2018.

SASAKI, Y. et al. Effect of antibiotics for infectious diarrhea on the duration of hospitalization: A retrospective cohort study at a single center in Japan from 2012 to 2015. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 24, n. 1, p. 59-64, 2008.

SCHILLER, L. R. Definitions, pathophysiology, and evaluation of chronic diarrhea. **Best Practice and Research Clinical Gastroenterology**, v. 26, n. 5, p. 551–562, 2012.

SCHILLER, L. R.; PARDI, D. S.; SELLIN, J. H. Chronic Diarrhea: Diagnosis and Management. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 15, n. 02, p. 182–193, 2017.

SESAPI - Secretária Estadual de Saúde Piauí. Disponível em: <<http://www.saude.pi.gov.br/noticias/2014-05-09/5841/diarreia-mata-uma-crianca-a-cada-15-segundos-em-todo-o-mundo.html>> Acesso em 18 de fevereiro de 2018.

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.

NEGREIROS, P. S. Eficácia do monoterpeneo α -terpineol na atividade antidiarreica em roedores. 2018. PPGFARM/NPPM/CCS/UFPI

SILVA, B. J. M. et al. Medicinal plants from the Brazilian Amazonian region and their antileishmanial activity: a review. **Journal of Integrative Medicine**, p. 1-12, 2018.

SILVA, F. V. et al. Beta-cyclodextrin enhanced gastroprotective effect of (-)-linalool, a monoterpene present in rosewood essential oil, in gastric lesion models. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 389, n. 11, p. 1245-1251, 2016.

SILVA, M. T. B. et al. α -Terpineol Induces Gastric Retention of Liquids by Inhibiting Vagal Parasympathetic Pathways in Rats. **Planta Med**, v.82, n. 15, p. 1329-1334, 2016.

SILVA, P. S. et al. Association of urinary phenolic compounds, inflammatory bowel disease and chronic diarrheal symptoms: Evidence from the National Health and Nutrition Examination Survey. **Environmental Pollution**, v. 229, p. 621-626, 2017.

SINGH, B.; SHARMA, R. A. Plant terpenes: defense responses, phylogenetic analysis, regulation and clinical applications. **3 Biotech**, v. 5, n. 2, p. 129-151, 2015.

SINGH, M.; JAVED, K. Chemical characterization and antimicrobial activity of *Calotropis gigantea* Linn. flower essential oil collected from northern plain of Índia. **International Journal of Advanced Biotechnology and Research**, v. 4, n. 4, p. 533-541, 2013.

SIQUEIRA, J. A. M., et al. Astrovirus infection in hospitalized children: Molecular, clinical and epidemiological features. **Journal of Clinical Virology**, v. 94, p. 79-85, 2017.

SMIEJA, M; GOLDFARB, D. M. Molecular Detection of Diarrheal Pathogens. **Clinical Microbiology Newsletter**, v 38, n. 17, p. 137–145, 2016.

SOUSA, D. P.; QUINTANS-JUNIOR, L.; ALMEIDA, R. N. Evolution of the Anticonvulsant Activity of α -Terpineol. **Pharmaceutical Biology**, v. 45, n. 1, p. 69-70, 2007.

SOUSA, F. B. M. et al. H₂S is a key antisecretory molecule against cholera toxin-induced diarrhoea in mice: Evidence for non-involvement of the AC/cAMP/PKA pathway and AMPK. **Nitric Oxide**, p. 1-12, 2017.

NEGREIROS, P. S. Eficácia do monoterpeneo α -terpineol na atividade antidiarreica em roedores. 2018. PPGFARM/NPPM/CCS/UFPI

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, R. et al. Gastroprotective activity of alpha-terpineol in two experimental models of gastric ulcer in rats. **Daru : journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences**, v. 19, n. 4, p. 277–281, 2011.

SPIES, L. A. Traveler's Diarrhea: An Update on Prevention and Treatment. **Journal of Midwifery & Women's Health**, v. 53, n. 3, p. 251-254, 2008.

SUGITA, K. et al. Prostaglandin E2 is critical for the development of niacin-deficiency-induced photosensitivity via ROS production. **Scientific Reports**, v. 3, n. 2973, p. 1-7, 2013.

SUH, J.; HAHN, W.; CHO, B. Recent Advances of Oral Rehydration Therapy (ORT). **Electrolyte Blood Press**, v. 8, p. 82-86, 2010.

SWEETSER, S. Evaluating the Patient With Diarrhea: A Case-Based Approach. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 87, n. 6, p. 596-602, 2012.

THIAGARAJAH, J. R.; VERKMAN, A. S. CFTR pharmacology and its role in intestinal fluid secretion. **Current Opinion in Pharmacology**, v.3, n. 6, p. 594-599, 2003.

THIAGARAJAH, J. R.; VERKMAN, A. S. New drug targets for cholera therapy. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 26, n. 4, p. 172-175, 2005.

THIAGARAJAH, J. R.; VERKMAN, A. S. CFTR Inhibitors for Treating Diarrheal Disease . **Clinical Pharmacology Therapeutics**, v. 92, n. 3, p. 287-90, 2012.

THIAGARAJAH, J. R.; VERKMAN, A. S. Chloride channel-targeted therapy for secretory diarrheas. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 13, n. 6, p. 888-894, 2013.

THIAGARAJAH, J. R. et al. Discovery and Development of Antisecretory Drugs for Treating Diarrheal Diseases. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v.12, n. 2, p. 204-209, 2014.

NEGREIROS, P. S. Eficácia do monoterpeneo α -terpineol na atividade antidiarreica em roedores. 2018. PPGFARM/NPPM/CCS/UFPI

TRADTRANTIP, L.; KO, E. A.; VERKMAN, A. S. Antidiarrheal Effect and Cellular Mechanisms of a Thai Herbal Remedy. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 8, n. 2, p. 1-11, 2014.

TRINH, C; PRABHAKAR, K. Diarrheal Diseases in the Elderly. **Clinics in Geriatric Medicine**, v. 23, n. 4, p. 833-856, 2007.

TROTTA, J. et al. Análise do conhecimento e uso popular de plantas de quintais urbanos no estado de São Paulo, Brasil. **REA – Revista de estudos ambientais**, v. 14, n. 3, p. 17-34, 2012.

UCHIYAMA, T.; CHESS-WILLIAMS, R. Muscarinic receptor subtypes of the bladder and gastrointestinal tract. **Journal of Smooth Muscle Research**, v. 40, n. 6, p. 237-247, 2004.

UNICEF (2016). UNICEF/HWO: Diarrhoea remains a leading killer of young children, despite the availability of a simple treatment solution. Disponível em: <<http://data.unicef.org/topic/child-health/diarrhoeal-disease.html>>. Acesso em 17 de novembro de 2017.

UNICEF (2018). UNICEF/HWO: Diarrhoea remains a leading killer of young children, despite the availability of a simple treatment solution. Disponível em: <<https://data.unicef.org/topic/child-health/diarrhoeal-disease/>>. Acesso em 02 de junho de 2018.

VAN DORP, E.; YASSEN, A. ; DAHAN, A. Naloxone treatment in opioid addiction: the risks and benefits. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 6, n. 2, p. 125-132, 2007.

VELÁZQUEZ et al., 2012. Management of Secretory Diarrhea. **Current Concepts in Colonic Disorders**, p. 67–84, 2012.

WALKER, C. L. et al. Global burden of childhood pneumonia and diarrhoea. **Lancet**, v. 381, n. 9875, p. 1405–1416, 2013.

WATSON, W. C.; GORDON JR. R. S. Studies on the digestion, absorption and metabolism of castor oil. **Biochemical Pharmacology**, v. 11, n. 3, p. 229-236, 1962.

WHITE, M. B.; RAJAGOPALAN, S.; YOSHIKAWA, T. T. Infectious Diarrhea: Norovirus and *Clostridium difficile* in Older Adults. **Clinics in Geriatric Medicine**, v. 32, n. 3, p. 509-522, 2016.

NEGREIROS, P. S. Eficácia do monoterpeneo α -terpineol na atividade antidiarreica em roedores. 2018. PPGFARM/NPPM/CCS/UFPI

WHYTE, L. A.; JENKINS, H. R. Pathophysiology of diarrhoea. **Paediatrics and Child Health**, v. 22, n. 10, p. 443-447, 2012.

WIERZBA, T. F.; BOURGIS, A. Defining cases of severe pediatric diarrhea for an efficacy trial of an enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) vaccine: Report on an international workshop, Washington DC, March 2016. **Vaccine**, v. 35, n. 4, p. 503-507, 2017.

WOOD, J. D.; GALLIGAN, J. J. Function of opioids in the enteric nervous system. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 16, n. 2, p. 17-28, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO (2017). Diarrhoeal disease. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/en/>>. Acesso em 26 de Janeiro de 2018.

YAMAHARA, J. et al. Chologogic action and characteristics of (+/-)-alpha-terpineol-beta-D-O-glucopyranoside, a new monoterpeneoid glucoside. **Chemical & pharmaceutical bulletin**, v. 33, n. 4, p. 1669–1675, 1985.

ZHANG, H. et al. Protective immunity of a Multivalent Vaccine Candidate against piglet diarrhea caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in a pig model. **Vaccine**, v. 36, n. 5, p. 723-728, 2018.

ZHU, W. et al. Discovery of a novel series of α -terpineol derivatives as promising anti-asthmatic agents: Their design, synthesis, and biological evaluation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 143, n. 1, p. 419-425, 2018.