



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

**AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DE UMA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA
SULFATADA OBTIDA DA ALGA MARINHA *Gracilaria intermedia*
(J AGARDH) COMO CANDIDATA A FÁRMACO PARA O
TRATAMENTO DE DIARREIAS AGUDAS**

ANA CAROLINA MACHADO LEÓDIDO

TERESINA-PI
2017

ANA CAROLINA MACHADO LEÓDIDO

**AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DE UMA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA
SULFATADA OBTIDA DA ALGA MARINHA *Gracilaria intermedia*
(J AGARDH) COMO CANDIDATA A FÁRMACO PARA O
TRATAMENTO DE DIARREIAS AGUDAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Ponto Focal Piauí, da Universidade Federal do Piauí, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Jand Venes Rolim Medeiros

TERESINA-PI
2017

L577a

Leódido, Ana Carolina Machado.

Avaliação pré – clínica de uma fração polissacarídica sulfatada obtida da alga marinha *Gracilaria intermedia* (JAGARDH) como candidata a fármaco para o tratamento de diarreias agudas. / Ana Carolina Machado Leódido. – Teresina: 2017.

138f.

Orientador: Prof. Dr. Jand Venes Rolim Medeiros.

Tese apresentada como requisito para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia/RENORBIO - Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, 2017.

1. Biotecnologia. 2 Rhodophyta. 3. Gracilariaceae. 4. Cólera, 5. *Escherichia coli*. 6. Toxicidade oral aguda. I. Título.

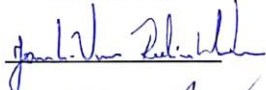




CDD: 660.6

FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE

ALUNO: ANA CAROLINA MACHADO LEODIDO

TÍTULO DO PROJETO: "AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DE UMA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA SULFATADA OBTIDA DA ALGA MARINHA *Gracilaria intermedia* (J AGARDH) COMO CANDIDATA A FÁRMACO PARA O TRATAMENTO DE DIARREIAS AGUDAS".

PROFESSOR ORIENTADOR: Prof. Dr. Jand Venes Rolim Medeiros

BANCA EXAMINADORA:	CONCEITO	ASSINATURA
Prof. Dr. Jand Venes Rolim Medeiros - UFPI (Presidente)	<u>SATISFATÓRIO</u>	
Prof. Dr. Daniel Fernando Pereira Vasconcelos - UFPI (Examinador)	<u>SATISFATÓRIO</u>	
Profa. Dra. Durcilene Alves da Silva - UFPI (Examinadora)	<u>SATISFATÓRIO</u>	
Prof. Dr. Joilson Ramos de Jesus – UFBA (Examinador)	<u>SATISFATÓRIO</u>	
Prof. Dr. Jose Delano Barreto Marinho Filho - UFPI (Examinador)	<u>Satisfatório</u>	

DATA DA AVALIAÇÃO: 17 de novembro de 2017.

HORÁRIO: 09:00h

LOCAL: no Auditório do Campus Ministro Reis Velloso da UFPI.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”. (Madre Teresa de Calcuta).

AGRADECIMENTOS

Primeiro de tudo, gostaria de agradecer a Deus por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades.

Ao Prof. Dr. Jand Venes Rolim Medeiros pela orientação, oportunidade de aprendizado e crescimento profissional.

Aos professores do programa de Pós-graduação em Biotecnologia da RENORBIO, pelas aulas interessantes e produtivas.

Ao Laboratório de Algas Marinhas da Universidade Federal do Ceará, em especial à professora Dra. Ana Lúcia Ponte Freitas e toda equipe, pela contribuição para a realização deste trabalho.

Aos membros da banca de qualificação e defesa, Prof. Dr. Daniel Fernando Pereira Vasconcelos, Prof. Dr. Joilson Ramos de Jesus, Prof^a. Dr^a. Durcilene Alves e Prof. Dr. José Delano Barreto Marinho Filho pelos pertinentes apontamentos que engrandeceram este trabalho.

Ao Laboratório de Físio-Farmacologia da Inflamação e Desordens Gastrointestinais (LAFIDG), Campus Ministro Reis Velloso, Universidade Federal do Piauí, pelo apoio técnico representado pela Msc. Francisca Beatriz de Melo Sousa.

Aos colegas de laboratório: Thiago Lopes, Nayara Alves, Luan Kelves, Douglas Soares, Bruno Iles, Gabriella Pacheco, Simone de Araújo, Ana Patrícia de Oliveira, Matheus Sombra, Caroline Brandão, Elenice Monte, José Júnior, Fabiana Moura, Kerolayne Nogueira, Dvison Pacífico, Monique Campos e Vanessa Meneses.

Aos amigos de turma do doutorado da RENORBIO: Adelaide Guimarães, Alyne Rodrigues, Erika Aparecida e Any Carolina pelas viagens descontraídas para assistir as aulas em Teresina.

Aos meus pais, Maria Donete Leódido e Mariano Lucas Leódido, que abdicaram de muitos projetos pessoais para que eu tivesse a oportunidade de ter uma boa formação profissional e por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos da minha vida.

A toda a minha família que sempre torceu pelo meu sucesso, em especial, a Mariane Leódido e Victor Leódido, pela amizade, apoio e incentivo.

Ao meu namorado, Manoel Dias, pela troca de conhecimentos, por me fazer feliz e e dar forças para trilhar um caminho de sucesso pessoal e profissional.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), FAPEPI (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Piauí), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior) e ao Ministério da Saúde pelo apoio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente participaram da produção desta tese, muito obrigada!

Ana Carolina Machado Leódido

*A Deus, por ter me provido de saúde e força para a
realização deste trabalho.
Aos meus pais, por me apoiarem nos momentos mais
importante da minha vida.*

LISTA DE SIGLA E ABREVIATURA

ADP	Difosfato de Adenosina
AMPc	Adenosina Monofosfato Cíclico
ANOVA	Análise de Variância
ATP	Trifosfato de Adenosina
Atr	Atropina
CCK	Colecistocinina
CFTR	Canal Regulador de Condutância Transmembranar da Fibrose Cística
CHCM	Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média
COX	Ciclooxigenase
DAG	1,2 Diacilglicerol
DL₅₀	Dose Letal Mediana
D.O.	Densidade Óptica
EPM	Erro Padrão da Média
ETEC	<i>Escherichia coli</i> Enterotoxigênica
FTIR	Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier
GM1	Monossialogangliosídeo 1
GMPc	Guanosina Monofosfato Cíclico
i.p.	Intraperitoneal
IP3	1,4,5 Trifosfato de Inositol
TL	Toxina Termolábil
mEq/L	Miliequivalente por litro
mM	Milimolar
mOsm/L	Miliosmol por litro
nm	Nanômetro
OECD	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAF	Fator de Ativação Plaquetária
PBS	Tampão Fosfato-Salina
PGE₂	Prostaglandina E ₂
Pi	Fosfato Inorgânico
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5 bifosfato
PKA	Proteína Cinase A
PLS	Polissacarídeos Sulfatados
PLS-Gi	Fração de Polissacarídeos Sulfatados extraídos de <i>Gracilaria intermedia</i>
RPM	Rotações por Minuto

s.c.	Subcutânea
Sal	Salina/ Soro Fisiológico
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SGTL1	Transportador Ativo de Glicose Dependente de Sódio Tipo 1
SNC	Sistema Nervoso Central
SNE	Sistema Nervoso Entérico
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SRO	Solução de Reidratação Oral
TC	Toxina da Cólera
TGO	Transaminase Glutâmico Oxalacética
TGP	Transaminase Glutâmico Pirúvica
TL	Toxina Termolábel
TS	Toxina Termoestável
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TP	Tempo de Protrombina
TTPA	Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada
UNICEF	Fundo das Nações Unidas para Infância
VCM	Volume Corpuscular Médio
v.o	Via Oral
VIP	Peptídeo Intestinal Vasoativo

LISTA DE FIGURAS

- REVISÃO DA LITERATURA –

Figura 1.	Corte transversal mostrando as camadas do intestino.....	21
Figura 2.	Mecanismos de transporte intestinal.....	25
Figura 3.	Percentual de óbitos em crianças menores de 5 anos atribuídos à diarreia (2015).....	31
Figura 4.	Enterotoxina e mecanismo patológico de hipersecreção de eletrólitos e água.....	43
Figura 5.	Fluxograma representando a metodologia seguida para o ensaio de toxicidade aguda.....	46
Figura 6.	Representação da estrutura química das unidades de dissacarídeos que formam as galactanas sulfatadas extraídas de algas vermelhas.....	51
Figura 7.	Aspecto macroscópico da alga marinha vermelha <i>Gracilaria intermedia</i> e sua classificação taxonômica.....	53

- CAPÍTULO I -

Figura 1.	Modelo de diarreia induzida pelo óleo de rícino para a avaliação do efeito anti-diarreico da PLS-Gi.....	82
Figura 2.	Escores atribuídos a diarreia induzida pelo óleo de rícino.....	82
Figura 3.	Modelo utilizado para avaliar o efeito da PLS-Gi sobre acúmulo de fluido intestinal (<i>enteropooling</i>) induzido por óleo de rícino.....	83
Figura 4.	Modelo utilizado para avaliar a atividade da Na ⁺ /K ⁺ - ATPase....	85
Figura 5.	Modelo utilizado para determinar o efeito da PLS-Gi sobre a motilidade gastrintestinal.....	86
Figura 6.	Modelo do trânsito gastrintestinal induzido pelo óleo de rícino utilizado para avaliar a influência da PLS-Gi sobre receptores opioides.....	87
Figura 7.	Modelo utilizado para investigar efeito da PLS-Gi sobre receptores colinérgicos.....	88
Figura 8.	Modelo utilizado para determinar o efeito da PLS-Gi sobre o esvaziamento gástrico.....	89
Figura 9.	Modelo utilizado para avaliar o efeito da PLS-Gi sobre a diarreia induzida pela toxina da cólera.....	91

Figura 10.	Modelo utilizado para determinar o efeito da PLS-Gi sobre a absorção intestinal.....	92
Figura 11.	Modelo utilizado para determinar o efeito da PLS-Gi sobre a diarreia induzida pela <i>Escherichia coli</i>.....	94
Figura 12.	Espectro Infravermelho da fração de polissacarídeos extraída de <i>Gracilaria intermedia</i> na região de número de onda entre 700 a 1400 cm⁻¹.....	98
Figura 13.	Efeito da fração de polissacarídeos sulfatados extraída de <i>Gracilaria intermedia</i> na fluidez das fezes.....	99
Figura 14.	Efeito da fração de polissacarídeos sulfatados extraída de <i>Gracilaria intermedia</i> na atividade da enzima Na⁺/K⁺-ATPase no intestino delgado de camundongos.....	101
Figura 15.	Efeito da fração de polissacarídeos sulfatados extraída de <i>Gracilaria intermedia</i> no trânsito intestinal em camundongos.....	103
Figura 16.	Efeito da fração de polissacarídeos sulfatados extraída de <i>Gracilaria intermedia</i> no esvaziamento gástrico.....	105
Figura 17.	Efeito da fração de polissacarídeos sulfatados extraídos de <i>Gracilaria intermedia</i> na secreção de fluidos induzida pela toxina da cólera em alças intestinais isoladas.....	107
Figura 18.	Efeito da fração de polissacarídeos sulfatados extraídos de <i>Gracilaria intermedia</i> sobre a ligação da toxina da cólera ao receptor GM1.....	109
Figura 19.	Efeito da fração de polissacarídeos sulfatados extraída de <i>Gracilaria intermedia</i> sobre o crescimento de <i>Escherichia coli in vitro</i>.....	111
Figura 20.	Secções histológicas coradas por Hematoxilina e Eosina do baço (A) e rim (B) de camundongos após administração da PLS-Gi (2.000 mg/kg, <i>v.o.</i>).....	113
Figura 21.	Secções histológicas coradas por Hematoxilina e Eosina do coração (A) e fígado (B) de camundongos após administração da PLS-Gi (2.000 mg/kg, <i>v.o.</i>).....	114
Figura 22.	Fotomicrografias de vilosidades do intestino delgado de camundongos após a administração da PLS-Gi (2.000 mg/kg, <i>v.o.</i>).....	115
Figura 23.	Diagrama do possível mecanismo de ação da PLS-Gi na diarreia induzida por óleo de rícino, toxina da cólera e toxina produzida pela <i>Escherichia coli</i> entrotóxicígenica.....	124

- ANEXO I-

**Declaração de aprovação do projeto pela Comissão de Ética em
Pesquisa Animal..... 133**

-ANEXO II-

**Artigo Publicado na *International Journal of Biological
Macromolecules*..... 134**

LISTA DE TABELAS

-REVISÃO DA LITERATURA –

Tabela 1.	Toxicidade aguda de polissacarídeos obtidos a partir de algas marinhas.....	50
-----------	---	----

- CAPÍTULO I -

Tabela 1.	Efeito da fração de polissacarídeos sulfatados extraídos de <i>Gracilaria intermedia</i> (PLS-Gi, 3-30 mg/kg, v.o.) na diarreia induzida por óleo de rícino em camundongos.....	99
-----------	---	----

Tabela 2.	Efeito da fração de polissacarídeos sulfatados extraídos de <i>Gracilaria intermedia</i> (PLS-Gi, 3-30 mg/kg, v.o.) no acúmulo de fluido intestinal (enteropooling) induzido pelo óleo de rícino em camundongos.....	101
-----------	--	-----

Tabela 3.	Efeito da fração de polissacarídeos sulfatados extraídos de <i>Gracilaria intermedia</i> (PLS-Gi, 30 mg/kg, v.o.) na diarreia induzida por <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica em camundongos.....	110
-----------	---	-----

Tabela 4.	Efeito dos polissacarídeos sulfatados extraídos da <i>Gracilaria intermedia</i> (PLS-Gi, 30 mg/kg, v.o.) no peso corporal mediante a indução de diarreia com <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica em camundongos.....	111
-----------	---	-----

Tabela 5.	Efeito da fração de polissacarídeos sulfatados extraídos de <i>Gracilaria intermedia</i> (PLS-Gi, 2.000 mg/kg, v.o.) nos parâmetros bioquímicos de camundongos.....	112
-----------	---	-----

Tabela 6.	Efeito da fração de polissacarídeos sulfatados extraídos de <i>Gracilaria intermedia</i> (PLS-Gi, 2.000 mg/kg, v.o.) no peso corporal e no peso relativo dos órgãos de camundongos.....	113
-----------	---	-----

- APÊNDICE C -

Tabela 1.	Parâmetros avaliados no ensaio de toxicidade oral aguda.....	136
-----------	--	-----

- APÊNDICE D -

Tabela 1.	Parâmetros hematológicos de camundongos após a administração da PLS-Gi (2.000 mg/kg, v.o.).....	138
-----------	---	-----

- APÊNDICE E -

Tabela 1.	Parâmetros bioquímicos de camundongos após a administração da PLS-Gi (2.000 mg/kg, v.o.).....	138
-----------	---	-----

RESUMO

A crescente procura por moléculas com potencial terapêutico tem despertado interesse cada vez maior por pesquisas científicas envolvendo organismos de origem marinha. Assim, o presente estudo teve como objetivo investigar o potencial terapêutico de uma fração polissacarídica sulfatada extraída da alga marinha *Gracilaria intermedia* (PLS-Gi) no tratamento de diarreias agudas. Os resultados obtidos a partir da extração, caracterização estrutural e investigação do efeito antidiarreico, antissecretor intestinal e toxicidade aguda da PLS-Gi em camundongos. A fração polissacarídica obtida pelo método de extração enzimática com papaína apresentou bom rendimento e ausência de contaminação por proteínas. A espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) da PLS-Gi revelou a presença de bandas características de agarana, com sulfatação nos C-6 dos resíduos de L-galactose. O pré-tratamento com PLS-Gi (3, 10, 30 mg/kg, *v.o*) reduziu significativamente as fezes totais e diarreicas, e o *enteropooling* ($p < 0,05$). A PLS-Gi (30 mg/kg, *v.o*) aumentou a Na^+/K^+ - ATPase gastrointestinal ($p < 0,05$) e reduziu o trânsito intestinal ($p < 0,05$), a partir do bloqueio de receptores colinérgicos, sem interferir no esvaziamento gástrico. No modelo de diarreia induzida pela toxina da cólera (TC), a PLS-Gi diminuiu o fluido intestinal e as perdas de íons Cl^- ao interagir com os monossialogangliosídeos (GM1) e a TC ($p < 0,05$). Os resultados obtidos pelo método de difusão em ágar mostraram ausência de zona de inibição nas concentrações de 10, 30 e 50 mg/mL, e sugerem que essas concentrações de PLS-Gi não exercem atividade antibacteriana frente a *E.coli*. Apesar disso, a PLS-Gi reduziu a diarreia induzida por *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) e preveniu a perda de peso dos animais ($p < 0,05$). Ademais, no estudo da toxicidade oral aguda, os animais não exibiram qualquer sinal de efeito adverso após 14 dias de observação, desse modo, estimou-se que o valor da DL_{50} para a administração oral de PLS-Gi é maior que 2.000 mg/kg, podendo ser enquadrada na Classe 5 segundo o *Globally Harmonized System* – GHS, demonstrando limitado potencial de toxicidade aguda. Diante dos resultados apresentados, este estudo evidenciou, pela primeira vez, que a PLS-Gi é capaz de diminuir a motilidade intestinal por meio da ação anticolinérgica, e controlar as diarreias induzidas pela TC e toxina produzida pela ETEC por meio da interação entre PLS-Toxina-GM1, reduzindo, assim, a perda de íons e fluidos para o lúmen intestinal. Ademais, a biodisponibilidade, o baixo custo e o caráter atóxico, tornam a PLS-Gi uma candidata para o tratamento de diarreias agudas.

Palavras-chave: Rhodophyta; Gracilariaceae; Cólera; *Escherichia coli*; Toxicidade oral aguda.

ABSTRACT

The demand for molecules with therapeutic potential has increasing interest in scientific research involving organisms of marine origin. Thus, the aim of this study was to investigate the therapeutic potential of a sulfated polysaccharide fraction derived from *Gracilaria intermedia* (PLS-Gi) in the treatment of diarrhea. The chapter I shows the results obtained from the extract, structurally characterize and investigation of the antidiarrheal effect, intestinal antisecretory and acute toxicity of PLS-Gi in mice. PLS-Gi obtained by enzymatic digestion with papain showed good yield and purity after extraction, without contamination by proteins. The Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) of SP-Gi revealed the presence of bands characteristic of agaran with sulphation of C-6 of L-galactosyl residues. Pretreatment with PLS-Gi (3, 10, 30 mg/kg, *v.o*) reduced total and diarrheal feces, and enteropooling ($p < 0.05$). PLS-Gi (30 mg/kg, *v.o*) increased the gastrointestinal Na^+/K^+ - ATPase ($p < 0.05$) and reduced the gastrointestinal transit from anticholinergic mechanisms ($p < 0.05$), without interfering with gastric emptying. In the model of diarrhea induced by cholera toxin (CT), PLS-Gi reduced fluid generation and loss of Cl^- by interacting with monosialoganglioside (GM1) and CT ($p < 0.05$). The results obtained by the agar diffusion method showed no inhibition zone at concentrations of 10, 30 and 50 mg/mL, these results suggest that these concentrations of PLS-Gi do not exert antibacterial activity against *E.coli*. However, PLS-Gi reduced the diarrhea induced by Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) and prevented weight loss in animals ($p < 0.05$). In addition, in the acute oral toxicity study, animals showed no sign of adverse effect after 14 days of observation, thus the value of LD_{50} for oral PLS-Gi was estimated to be greater than 2.000 mg/kg and may be classified as Class 5 of *Globally Harmonized System* – GHS, showing a reduced potential for acute toxicity. Given the results present, this study showed for the first time that PLS-Gi is able to decrease intestinal motility through anticholinergic action and to control diarrhea induced by CT and toxin produced by ETEC through the interaction between PLS- Toxin-GM1, thus, reducing the loss of ions and fluids to the intestinal lumen. In addition, bioavailability, low cost and non-toxic character make PLS-Gi a candidate for the treatment of acute diarrhea.

Keywords: Rhodophyta; Gracilariaceae; Cholera; *Escherichia coli*; Acute oral toxicity.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
2. OBJETIVOS.....	20
2.1. OBJETIVO GERAL.....	20
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	21
3.1. CONSIDERAÇÕES PRELIMINARES.....	21
3.1.1. MORFOLOGIA DO INTESTINO.....	21
3.1.2. MOTILIDADE GASTROINTESTINAL.....	22
3.1.3. MECANISMOS DE TRANSPORTE DE FLUIDOS INTESTINAIS.....	24
3.2. CONSIDERAÇÕES SOBRE AS DIARREIAS.....	27
3.2.1. CLASSIFICAÇÃO DAS DIARREIAS.....	28
3.2.2. EPIDEMIOLOGIA.....	31
3.2.3. PREVENÇÃO, DIAGNÓSTICO E MANEJO.....	32
3.3. TRATAMENTO FARMACOLÓGICO.....	34
3.3.1. AGENTES ANTIMOTILIDADE.....	34
3.3.1.1. OPIOIDES.....	34
3.3.1.2. ANTAGONISTAS DE RECEPTORES MUSCARÍNICOS.....	35
3.3.1.3. AGONISTAS DOS RECEPTORES α 2-ADRENÉRGICO.....	36
3.3.2. AGENTES ANTISSECRETORES.....	36
3.3.3. ANTIBIÓTICOS.....	37
3.3.4. PROBIÓTICOS.....	37
3.4. USO DE PRODUTOS NATURAIS PARA O TRATAMENTO DAS DIARREIAS.....	38
3.5. MODELOS EXPERIMENTAIS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIDIARREICA E TOXICIDADE.....	40
3.6. TOXICOLOGIA DE PRODUTOS NATURAIS.....	44
3.7. CONSIDERAÇÕES SOBRE ALGAS MARINHAS E POLISSACARÍDEOS SULFATADOS.....	47
3.7.1. AÇÕES FARMACOLÓGICAS DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS E TOXICIDADE.....	48
3.7.2. POLISSACARÍDEOS SULFATADOS EXTRAÍDOS DA ALGA VERMELHA <i>Gracilaria intermedia</i>	51

4. CAPÍTULO I - AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO ANTIDIAREICO E DA SEGURANÇA DE UMA FRAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS EXTRAÍDOS DA ALGA MARINHA <i>Gracilaria intermedia</i>.....	75
Resumo.....	76
Introdução.....	77
Materiais e Métodos.....	78
Resultados.....	98
Discussão.....	117
Conclusão.....	124
Referências.....	126
5. CONCLUSÃO.....	132
ANEXO I. DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELA COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL.....	134
ANEXO II. ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA <i>INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES</i>.....	135
APÊNDICE A. PARÂMETROS AVALIADOS NO ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA.....	137
APÊNDICE B. PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS DE CAMUNDONGOS APÓS A ADMINISTRAÇÃO DA PLS-Gi (2.000 mg/kg, v.o.).....	138
APÊNDICE C. PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DE CAMUNDONGOS APÓS A ADMINISTRAÇÃO DA PLS-Gi (2.000 mg/kg, v.o.).....	138

1. INTRODUÇÃO

A diarreia pode ser definida como um aumento da frequência de evacuações, 3 ou mais vezes em um período de 24 horas, associada a modificação da consistência das fezes, amolecidas ou líquidas (ASRIE et al., 2016; WHYTE; JENKINS, 2012; MATHAN, 1998). Vários fatores são responsáveis pelo aparecimento da diarreia, como a ansiedade, agentes infecciosos, toxinas, intolerância alimentar e medicamentos (MORAES; CASTRO, 2014).

Mais de 700 fármacos tem sido relatados como causadores dessa disfunção, entre esses, antimicrobianos, antiácidos contendo magnésio, produtos com lactose ou sorbitol, análogos de prostaglandinas, antineoplásicos, colchicina, agentes colinérgicos e drogas antiarrítmicas (CHASSANY et al., 2000). Além disso, esse distúrbio gastrointestinal é uma complicação comum da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), ocorrendo em quase 90% dos casos (SHAH et al., 2016).

Nos países em desenvolvimento, a diarreia é uma importante causa de mortalidade em crianças com menos de 5 anos de idade (UNICEF, 2016). Contudo, a utilização da solução de reidratação oral (SRO) pode reduzir de forma significativa a mortalidade, mas não a morbidade (BINDER et al., 2009; MATHAN, 1998). Assim, a procura por medicamentos que atuem reduzindo o volume das fezes e/ou o tempo do episódio diarreico tem sido alvo de uma busca constante (BRANDT; DE CASTRO; DA SILVA, 2015).

Nesse contexto, a Organização Mundial da Saúde (OMS), juntamente com o Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF) criaram um programa de controle de diarreias, que encoraja o uso de medicamentos a base de produtos naturais, devido a sua eficácia, acessibilidade e baixo custo, juntamente com práticas de educação em saúde e abordagens de prevenção (KOMAL; RANA, 2013; UNICEF; WHO, 2009).

Grande porcentagem das substâncias químicas lançadas como fármacos possuem alguma relação com metabólitos isolados de organismos vivos (ATANASOV et al., 2015). Entre os compostos bioativos de origem natural, os polissacarídeos tem se destacado por apresentarem inúmeras propriedades farmacológicas (LI et al., 2015; CHAVES et al., 2013; SHAO et al., 2013) e, recentemente, um estudo pioneiro mostrou a atividade antidiarreica de um heteropolissacarídeo complexo extraído do exsudato de *Anacardium occidentale* L., conhecido popularmente como cajueiro, em modelos de diarreia aguda (ARAÚJO et al., 2015).

Não obstante, os polissacarídeos sulfatados obtidos a partir de algas marinhas (COSTA et al., 2010) vêm se destacando como alternativa terapêutica promissora, dos quais inúmeras atividades biológicas têm sido descritas, tais como: antioxidante (BARAHONA et al., 2011), anti-inflamatório, antinociceptivos (DELGADO et al., 2013), anticoagulante (CIANCIA et al., 2010), anticâncer (SITHRANGA; KATHIRESAN, 2010), antiviral (BOUHLAL et al., 2011) e gastroprotetora (SILVA et a., 2011).

Nesse contexto, as algas marinhas pertencentes ao gênero *Gracilaria* possuem polissacarídeos do tipo ágar, constituídos por resíduos alternantes de β -D-galactose e α -L-galactose com grupamentos hidroxila substituídos naturalmente por ésteres de sulfato (DELATTRE; FENORADOSOA; MICHAUD, 2011). Várias espécies desse gênero, incluindo, a *Gracilaria intermedia* são encontradas em abundância na região nordeste brasileira (MARINHO-SORIANO; BOURRET, 2005).

Entretanto, existem poucos estudos envolvendo essa alga, tais como análises filogenéticas (GURGEL; FREDEIRCQ; NORRIS, 2008) e distribuição ecológica (WYNNE; BRADSHAW; CARRINGTON., 2014). Além disso, têm sido relatadas propriedades anti-inflamatória, antinociceptiva (COSTA et al., 2014) e antioxidante (CASTRO et al., 2014). Contudo, nenhuma avaliação toxicológica desse polímero foi realizada para a identificação de riscos à saúde e possíveis efeitos de sua exposição.

Os estudos têm demonstrado que cada macromolécula pode possuir conformação estrutural única e, portanto, apresentar atividade biológica variada, muitas vezes mais potentes que outros polissacarídeos ou compostos já descritos (ROCHA et al., 2004). Esses dados, associados ao efeito antidiarreico de polissacarídeos extraídos de algas marinhas vermelhas (SOUSA et al., 2016; COSTA et al., 2016), justificam a investigação da potencialidade farmacológica desse produto natural em distúrbios intestinais, como a diarreia, visto que essa manifestação clínica é uma importante causa de mortalidade, principalmente em crianças, afeta a qualidade de vida da população, gera importantes demandas para as redes de serviços de saúde e que atualmente dispõe de tratamentos específicos, mas que acarretam importantes efeitos adversos.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Caracterizar e investigar o potencial terapêutico de uma fração polissacarídica sulfatada obtida da alga *Gracilaria intermedia* (PLS-Gi) no tratamento de diarreias agudas.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair e caracterizar estruturalmente a fração polissacarídica obtida após a extração por meio da Espectrometria na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).
- Avaliar a toxicidade oral aguda da PLS-Gi em camundongos.
- Investigar os efeitos fisiológicos da PLS-Gi na atividade gastrointestinal.
- Avaliar a interação da PLS-Gi em receptores envolvidos na função gástrica e intestinal.
- Avaliar o efeito da PLS-Gi em modelo de diarreia secretora induzida pela toxina da cólera (TC).
- Investigar a ação da PLS-Gi, em modelos *in vivo* e *in vitro*, sobre a *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC).

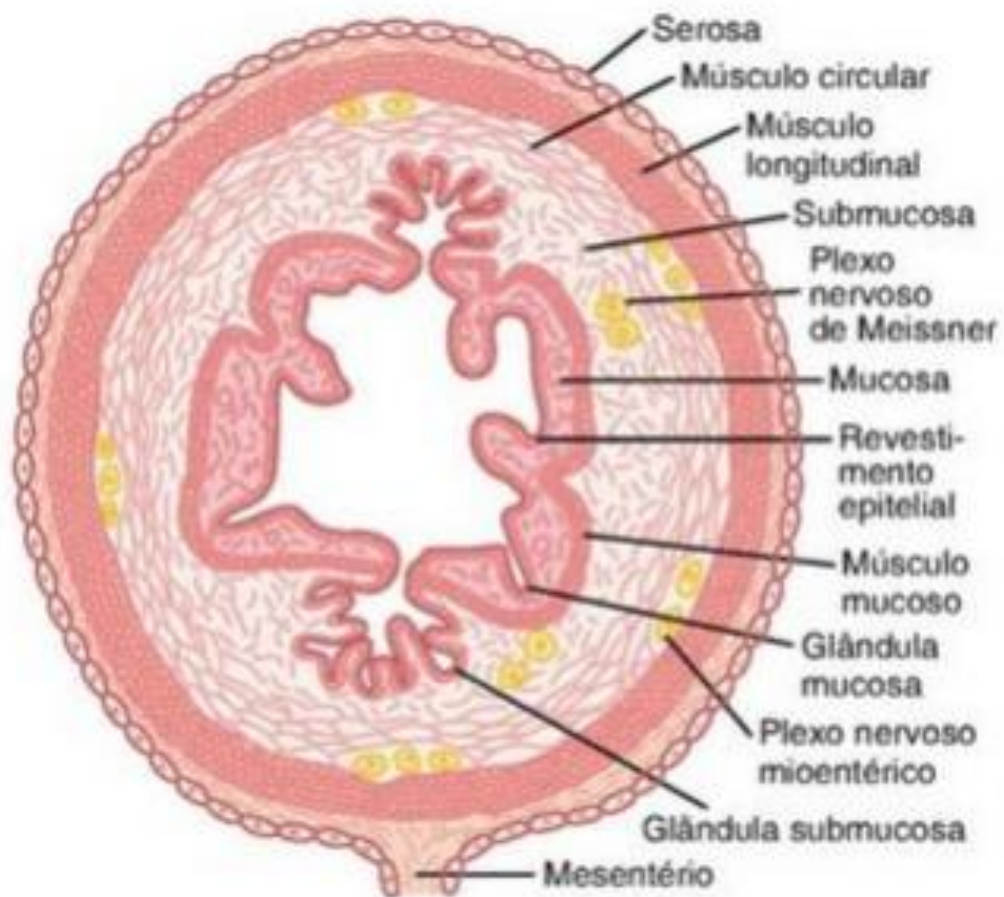
3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. CONSIDERAÇÕES PRELIMINARES

3.1.1. MORFOLOGIA DO INTESTINO

Como em outras partes do trato digestório, de dentro para fora, a parede do intestino é formada por quatro túnicas: mucosa, submucosa, muscular própria (camada muscular lisa circular e camada muscular lisa longitudinal) e serosa (Figura 1) (OVALLE; NAHIRNEY, 2008).

Figura 1. Corte transversal mostrando as camadas do intestino.



Fonte: GUYTON; HALL, 2011.

A mucosa reveste internamente o trato gastrointestinal, sendo constituída por uma camada de células epiteliais, lâmina própria e muscular. Nessa camada está presente uma parede pregueada com estruturas que aumentam a superfície de absorção. Adjacente à mucosa encontra-se a submucosa, que é composta de tecido conjuntivo com vasos sanguíneos e linfáticos, onde está presente o plexo submucoso, uma das redes nervosas do SNE. Próximo à

camada submucosa está a camada muscular externa, que é consituída de duas camadas de músculo liso, a circular e a longitudinal, onde encontra-se o plexo mioentérico, a mais importante rede nervosa do SNE. E por último, está localizada a camada serosa, que fornece uma cobertura externa do trato digestório, e é uma continuação da membrana peritoneal, que reveste a cavidade abdominal (SILVERTHORN, 2010; JANKOWSKI; GOODLAD; WRIGHT, 1994).

A camada mais interna do intestino, a mucosa, é formada por um epitélio de revestimento contendo enterócitos (células colunares, que tem função absorptiva), células caliciformes (importantes na produção de muco), células de Paneth (cujos grânulos contêm lisozimas, enzimas com atividade antibacteriana), células-tronco e células enteroendócrinas. Contudo, o número e a distribuição dessas células variam nas diferentes zonas do epitélio (BERTONI; GABELLA, 2001; VIGUERA et al., 1999).

De modo geral, os segmentos que compõem o intestino apresentam estruturas histológicas semelhantes, entretanto, é possível identificar pequenas variações morfofuncionais (DESESSO; JACOBSON, 2001; STEVENS; LOWE, 2001).

3.1.2. MOTILIDADE GASTROINTESTINAL

A atividade motora da musculatura lisa do trato gastrointestinal é responsável por misturar os alimentos com as secreções gastrintestinais, degradá-los mecanicamente e propelir o bolo alimentar ao longo de todo trato (BROWNING; TRAVAGLI, 2014).

As células que formam a camada muscular lisa do intestino são conectadas eletricamente por *gap junctions*. Essa organização faz com que o potencial de ação gerado em uma célula se propague para todas as células da camada, permitindo assim, a geração de padrões de contrações coordenadas (RUMESSEN; VANDERWINDEN, 2003). O músculo liso do trato gastrointestinal é excitado por uma atividade elétrica intrínseca, contínua e lenta, que dissipa potenciais de ação, responsáveis pelas ondas peristálticas em conjunto com o SNE (SANDERS, 1996).

Essas células musculares são formadas por filamentos de actina, miosina, proteína reguladora (a calmodulina) e uma membrana plasmática com muitos canais de cálcio voltagem-dependente, principais responsáveis pelo potencial de ação nesse tipo de célula. Os íons cálcio agem diretamente sobre o mecanismo contrátil do músculo liso (BERRIDGE, 2008).

Múltiplos sinais regulam a motilidade intestinal, como: nervosos, químicos, hormonais e mecânicos. Os neurônios do SNE liberam diversos neurotransmissores e neuromoduladores, incluindo acetilcolina, norepinefrina e serotonina (MCCORRY, 2007).

No trato gastrointestinal a acetilcolina, geralmente, exerce atividade excitatória, esse neurotransmissor atua nos receptores muscarínicos do tipo M_3 que está associado à proteína Gq. Após a ligação do agonista ao seu receptor, ocorre a ativação da proteína Gq, que por sua vez, ativa a fosfolipase C, que participa da formação de segundos mensageiros. Depois de ativa, a proteína Gq degrada o fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP_2), presente na membrana, em 1,4,5 trifosfato de inositol (IP_3) e 1,2 diacilglicerol (DAG) (HAGA, 2013; NELSON; COX, 2006). O IP_3 produzido migra pelo citoplasma e se liga aos receptores no retículo sarcoplasmático, promovendo a liberação de Ca^{2+} , que atua nos receptores de rianodina e induz a liberação de mais cálcio, fenômeno também conhecido como liberação de cálcio induzido pelo cálcio, que desempenha um papel importante no início do processo de contração do músculo liso (LEE; KEENER, 2008).

Por outro lado, a noradrenalina, liberada por terminações nervosas noradrenérgicas, produz potenciais inibidores que levam ao relaxamento do músculo liso (HENRY; GOLDIE, 1990). Do mesmo modo, a serotonina ao interagir com receptores 5-hidroxitriptamina tipo 3 (HT_3) diminui a motilidade, contudo, ao ligar-se a receptores do tipo 5- hidroxitriptamina tipo 4 (HT_4), a serotonina aumenta a atividade pró-cinética no intestino (UGHTON; FOSTER; WHORWELL, 2000; RMAN; BURLEIGH, 1993).

A motilidade gastrointestinal pode ainda ser regulada por hormônios intestinais, entre esses: grelina, motilina, secretina, colecistocinina, peptídeo inibitório gástrico (CHAUDHRI; SMALL; BLOOM, 2006) e por outras substâncias, incluindo a prostaglandina (DING et al., 1997) e óxido nítrico (CHEN et al., 2010). Estudos mostram que a liberação do óxido nítrico ativa a produção de monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) que, por sua vez, pode afetar os canais iônicos, a homeostase de Ca^{2+} , fosfatases ou vários desses fatores mencionados, conduzindo também ao relaxamento do músculo liso (VAN GELDRE; LEFEBVRE, 2004).

Assim, a regulação do tônus do músculo liso é fundamental para diversas funções biológicas. Desse modo, o funcionamento inadequado pode resultar em diversas patologias como: hipertensão, asma, disfunção erétil, cólicas uterinas, diarreias, entre outras (SOMLYO; SOMLYO, 1994).

3.1.3. MECANISMOS DE TRANSPORTE DE FLUIDOS INTESTINAIS

A função global do trato gastrointestinal é degradar os alimentos em componentes que possam ser absorvidos e utilizados pelo corpo, e excretar o material não absorvível. Desse modo, seus diferentes segmentos anatômicos apresentam funções específicas no que diz respeito à digestão e absorção. Enquanto o intestino delgado é a principal área promotora da digestão e onde começa a absorção dos alimentos, o intestino grosso é responsável pelo transporte de eletrólitos e água (BAYNES; DOMINICZAK, 2007).

Em um período de 24 horas, cerca de 10 L de fluidos entram e saem do trato gastrointestinal: 1 L de saliva, contendo eletrólitos, proteínas e muco, 7 L de secreções intestinais, além da ingestão de 2 L de água. A maior parte dos fluidos é reabsorvida no intestino, resultando em um conteúdo eletrolítico fecal que é semelhante ao do plasma, e apenas cerca de 150-250 mL de água é excretada nas fezes (STRASINGER; DI LORENZO, 2009).

O transporte de fluidos no intestino, assim como em outros epitélios, ocorre de forma secundária ao transporte ativo de eletrólitos, acompanhado pelo transporte passivo paracelular, através de junções celulares, e por meio de canais aquaporinas, presentes na membrana celular. Esses transportadores são constitutivamente ativos, contudo, eles podem ser modulados por segundos mensageiros, incluindo o monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) e Ca^{2+} (FIELD, 2003).

Histologicamente, a absorção é realizada pelas células que compõem as vilosidades intestinais e a secreção é realizada pelas células que formam as criptas intestinais (THIAGARAJAH; VERKMAN, 2012). No epitélio intestinal, o movimento de fluidos é dirigido por transportadores ativos de íons, incluindo Na^+ , K^+ , Cl^- , H^+ , bicarbonato (HCO_3^-), e solutos, principalmente, a glicose (BAYNES; DOMINICZAK, 2007).

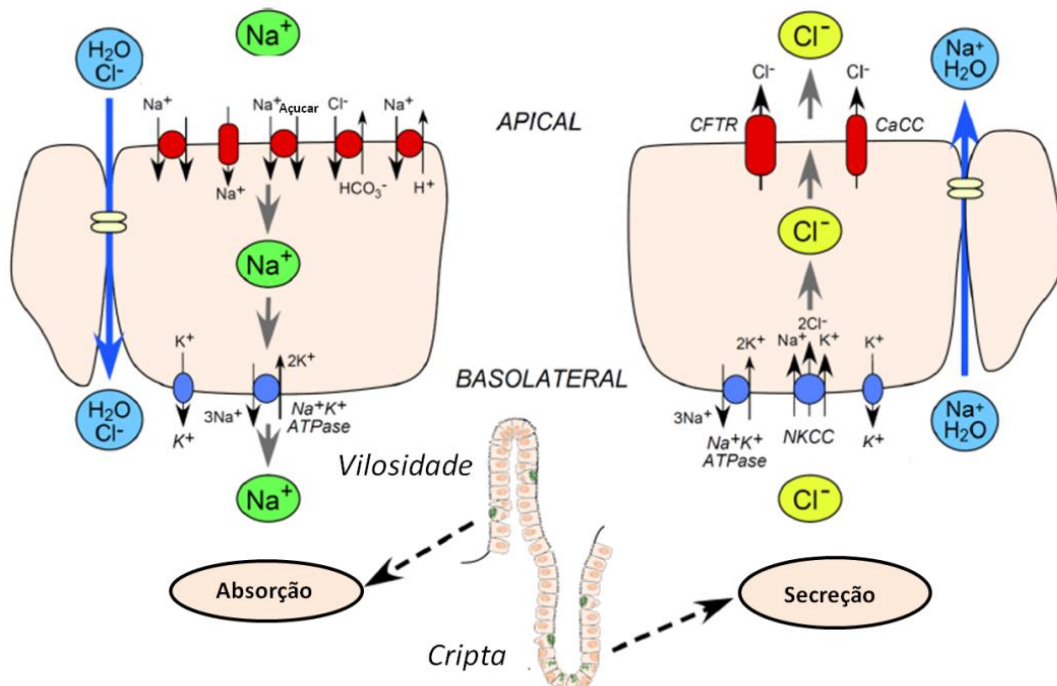
O Na^+ entra nas células epiteliais do jejuno por meio de diferentes transportadores, a membrana apical contém transportadores, incluindo os cotransportadores Na^+ - monossacarídeos (Na^+ - glicose e Na^+ - galactose), cotransportadores Na^+ - aminoácidos e Na^+/H^+ (NHE). Após entrar na célula, o Na^+ é expelido através da membrana basolateral via $\text{Na}^+ \text{K}^+$ - ATPase, que transporta Na^+ para fora da célula e K^+ para o seu interior (3 Na^+ por cada 2 K^+). A absorção de Na^+ na membrana apical ocorre também através da proteína transportadora de Na^+/H^+ , que usa H_2O e o CO_2 intracelular, convertidos a H^+ e HCO_3^- na presença da anidrase carbônica. O H^+ é secretado no lúmen pela proteína Na^+/H^+ e o HCO_3^- é

absorvido pelo sangue. O íleo contém os mesmos mecanismos de transporte que o jejuno, e adicionalmente, uma proteína transportadora de $\text{Cl}^- - \text{HCO}_3^-$, onde ocorre a absorção efetiva de NaCl (COSTANZO, 2014).

Os mecanismos de absorção nas células do cólon são similares aos das células renais. A membrana apical contém canais de Na^+ e K^+ , que são responsáveis pela absorção de Na^+ e pela secreção de K^+ . Assim, como nas células renais, a aldosterona, leva ao aumento da reabsorção de Na^+ , e secundariamente o aumento da secreção de K^+ (COSTANZO, 2014).

Na absorção do cloreto, anion essencial para o equilíbrio hídrico, o principal mecanismo envolvido é dependente de gradientes de concentração e de potenciais de membrana. O cloreto presente no lúmen intestinal passa diretamente para dentro dos espaços laterais através das zônulas oclusivas, que são permeáveis a pequenos ânions (Figura 2) (THIAGARAJAH; VERKMAN, 2012).

Figura 2. Mecanismos de transporte intestinal. À esquerda, a absorção de líquidos nas vilosidades envolvendo o transporte de Na^+ , via transportadores presentes na região apical da membrana, como o Na^+/H^+ (NHE), o co-transportador de Na^+ -glicose (SLGT-1), e a Na^+/K^+ ATPase na porção basolateral, que dirige o fluxo de Cl^- e água. A proteína transportadora de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ na região apical, é importante para a captação de Cl^- . À direita, a secreção de fluidos intestinais, que ocorre principalmente nas criptas e envolve o transporte de Cl^- através do CFTR e CaCC, com o fluxo passivo de Na^+ e água. Cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ (NKCC), que exerce papel importante na captação basolateral de Cl^- .



Fonte: Adaptado de THIAGARAJAH; VERKAMN, 2012.

Além desse mecanismo, a absorção de Cl^- ocorre por meio da proteína transportadora de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, que movimentam o bicarbonato para o lúmen intestinal, aumentando o pH luminal. Já a captação basolateral de Cl^- ocorre através do cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ (NKCC), esse mecanismo é dirigido pelo gradiente de concentração produzido pela $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ e canais basolaterais de K^+ (BAYNES; DOMINICZAK, 2007).

As células epiteliais que revestem as criptas intestinais secretam fluidos, esse transporte é dirigido, principalmente, pelo efluxo de Cl^- , que cria uma força eletroquímica para a saída paracelular de Na^+ e dirige a força osmótica para a expulsão da água. A secreção luminal de cloreto ocorre através do Regulador de Condutância Transmembranar de Fibrose Cística (CFTR). Além disso, esse canal tem também função reguladora, pois sua fosforilação inibe a proteína Na^+/H^+ (NHE), diminuindo a absorção de Na^+ (BAYNES; DOMINICZAK, 2007). Ademais, o gradiente eletroquímico que dirige a secreção de Cl^- é regulado ainda pelos canais de Cl^- ativado por Ca^{2+} (CaCCs) (BARRETT; KEELY, 2000).

De modo geral, os estímulos responsáveis por aumentar ou diminuir a secreção intestinal são mecânicos, nervosos, hormonais e químicos. A regulação mecânica é causada pela distensão da parede intestinal, havendo a estimulação de glândulas entéricas, e o aumento acentuado de suas secreções (SANIOTO; AIRES, 1999).

A regulação nervosa é considerada o mecanismo mais importante da secreção entérica, sendo desencadeada por reflexos locais provocados por estímulos táteis, irritativos ou pela presença do quimo no intestino. A estimulação vagal aumenta a secreção do suco entérico duodenal, porém, não afeta as secreções do jejuno e íleo. Ademais, agonistas do sistema parassimpático, como a acetilcolina e a fisostigmina (SANIOTO; AIRES, 1999), e o peptídeo intestinal vasoativo agem em neurônios secretores, estimulando a secreção intestinal de eletrólitos e água (KATZUNG, 2004).

Por outro lado, a secreção intestinal também é afetada por neurotransmissores, como as encefalinas (TURVILL; FARTHING, 1997), que ligam-se a receptores opioides do tipo δ (delta) promovendo a diminuição nos níveis de AMPc e a redução da secreção de eletrólitos e água. Devido a essa propriedade, o potencial antissecretor de moléculas inibidoras de encefalinas tem sido explorado (FARTHING, 2002). Do mesmo modo, a propriedade antissecretora pode ser desencadeada pelo Neuropeptídeo Y, substância encontrada em alguns

neurônios do SNE, que tem a capacidade de inibir o fluxo intestinal de eletrólitos e água (KATZUNG, 2004).

Em relação à regulação hormonal da secreção intestinal, secretina e colecistocinina exercem papel importante. Ambas são liberadas na corrente sanguínea em resposta ao conteúdo ácido (pH=5), gorduroso e hipertônico que chegam ao duodeno e estimulam a secreção intestinal (SANIOTO; AIRES, 1999).

Na regulação química, agentes irritantes, e toxinas produzidas por bactérias como o *Vibrio cholerae* e *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC), produzem o aumento do efluxo de Cl^- por meio de múltiplas vias de sinalização. Nesses casos, a secreção de Cl^- ocorre por meio da elevação dos níveis de AMPc e GMPc, que ativam os canais CFTR, canais de Cl^- ativados por Ca^{2+} (CaCC) e canais basolaterais de K^+ (THIAGARAJAH et al., 2004).

Estudos têm mostrado que a serotonina induz a secreção de fluidos intestinais, e exerce um papel chave na fisiopatologia da diarreia secretória induzida pela toxina da cólera. Visto que, essa toxina tem a capacidade de desencadear a liberação de serotonina pelas células enterocromafins, ativando estruturas neuronais via receptores 5-HT₃, levando a uma abundante secreção de fluidos (BEARCROFT; PERRETT; FARTHING, 1996).

Ademais, o papel da prostaglandina E₂ (PGE₂) no aumento da secreção intestinal de eletrólitos e água também tem sido demonstrado (MATUCHANSKY; MARY; BERNIER., 1976). A PGE₂ estimula a atividade da adenilato ciclase intestinal (KIMBERG et al., 1971), elevando os níveis de AMPc, que modifica o fluxo de Na^+ e Cl^- e aumenta a secreção intestinal (BUKHAVE; RASK-MADSEN, 1980).

3.2. CONSIDERAÇÕES SOBRE AS DIARREIAS

As principais características da diarreia são o aumento do número de evacuações e perda da consistência das fezes (ASRIE et al., 2016; WHYTE; JENKINS, 2012; MATHAN, 1998). O principal determinante da consistência e do volume fecal é o conteúdo líquido, que reflete o equilíbrio entre a ingestão, absorção e a secreção de água e eletrólitos ao longo do trato gastrointestinal (LONGSTRETH et al., 2006).

Assim, a presença de perturbações fisiológicas no intestino delgado e/ou quando a capacidade absorptiva do cólon (2-3 L por dia) é ultrapassada, ocorre um enorme desequilíbrio no balanço hídrico do tubo digestivo (PONCE, 2010). Mudanças no fluxo de água ocorrem, principalmente, devido a uma inibição na absorção de Na^+ e Cl^- e/ou aumento na secreção de

Cl⁻ (KUNZELMANN; MALL, 2002). Desse modo, a água segue impulsionada por forças osmóticas envolvendo aquaporinas e via transporte paracelular (ROSENTHAL et al., 2010).

Além disso, a viscosidade do bolo fecal depende também da intensidade da propulsão ou motilidade intestinal (FIELD; SEMRAD, 1993). Desse modo, observa-se uma redução da absorção e/ou uma hipersecreção de eletrólitos e água, juntamente com um aumento da motilidade intestinal na diarreia (FIELD; SEMRAD, 1993).

3.2.1. CLASSIFICAÇÃO DAS DIARREIAS

A diarreia pode ser classificada quanto a sua fisiopatologia ou quanto ao seu tempo de duração. Considerando os critérios fisiopatológicos, as diarreias são classificadas em osmótica, secretora, motora e inflamatória (GAUNDALINI; VAZIRI, 2011). A maioria das etiologias tem uma fisiopatologia complexa, envolvendo um ou mais desses mecanismos (TERRIN, CANANI, 2011; DANTAS, 2004).

Na diarreia osmótica, a presença de quantidade elevada de solutos de baixa absorção na luz intestinal exerce força osmótica que leva a retenção de água no intestino grosso (KENT; BANKS, 2010) e apresenta material fecal ácido, com maior perda de potássio do que de sódio (DOUGHTY, 2006). Esse desequilíbrio hidroeletrólítico é agravado pela eventual presença de vômitos e febre, levando o indivíduo à desidratação aguda, que pode resultar em hipovolemia, choque e morte, se não tratada adequadamente (BARBUTI, 2008).

A ingestão de substratos pouco absorvidos (manitol e sorbitol) ou intolerância a carboidrato (lactose), ao glúten (doença celíaca), ingestão excessiva de laxantes ou antiácidos com magnésio e outros fármacos (Metformina e Xenical) são causas frequentes de diarreia osmótica (KENT; BANKS, 2010; CHESKIN; MILLER, 2001). Além disso, mudanças estruturais do intestino também podem acarretar o aumento do conteúdo líquido na luz intestinal, devido à diminuição da capacidade de absorção de fluidos e nutrientes. A presença de um processo inflamatório, por exemplo, ocasionado por infecções ou doença inflamatória (doença de Crohn) também acarretam mudanças estruturais no intestino e conseqüentemente diminuem a absorção intestinal (POWELL; JENKINS, 2012). Do mesmo modo, a desnutrição, provoca atrofia reversível das vilosidades intestinais, que por sua vez diminui a velocidade de absorção de nutrientes, prolongando a presença de solutos osmoticamente ativos que puxam a água para o lúmen intestinal (POWELL; JENKINS, 2012).

A diarreia secretora é causada por estímulos que modificam o transporte de íons pelo epitélio de revestimento, que passa a reter maior quantidade de água, responsável pelo desarranjo intestinal (BRAUNWALD et al., 2002). Os indivíduos acometidos com esse quadro apresentam um volume de fezes muito aumentado, podendo chegar a mais de 1 L por dia, com pH neutro e sem alterações na quantidade de fezes produzidas em jejum (DOUGHTY, 2006).

Entre os estímulos que provocam a diarreia secretora estão vírus (rotavírus e norovírus), toxinas bacterianas produzidas por *Staphylococcus aureus*, *E. coli enterotoxigênica* (ETEC) e *V. cholerae*, protozoários (*Giardia*, *Isospora belli* e *Cryptosporidium*) (KENT; BANKS, 2010; DANTAS, 2004; CHESKIN; MILLER, 2001; WALKER; HALL; HURST 1990). Esses micro-organismos ou toxinas são capazes de ativar mecanismos que aumentam a produção de segundo mensageiros (AMPc, PGE₂ e Ca⁺), que estimulam a secreção intestinal (BARBUTI, 2008).

O aumento da concentração intracelular de AMPc inibe a absorção de Na⁺ no lúmen pelos vilos do intestino delgado e estimula a secreção de Cl⁻ pelas criptas para a luz intestinal (BARBUTI, 2008). A secreção de íons Cl⁻ na membrana apical ocorre principalmente através do CFTR, segundos mensageiros, como o AMPc, regulam o funcionamento desse canal por meio da ativação de proteínas quinases. Desse modo, processos patológicos que aumentam a concentração intracelular de AMPc, promovem a ativação da proteína quinase A (PKA), a abertura de canais CFTR e, conseqüentemente, a secreção de Cl⁻ e água (WONGSAMITKUL et al., 2010).

Além dos agentes infecciosos, certos hormônios em excesso, como o peptídeo intestinal vasoativo encontrado em tumores pancreáticos, a calcitonina produzida pelo câncer medular da tireóide, a serotonina liberada em tumor carcinóide, etanol, medicamentos (Furosamida), ácidos biliares, laxantes (óleo de rícino e fenolftaleína) podem estimular a secreção excessiva responsável pelo desarranjo intestinal (KENT; BANKS, 2010; DANTAS, 2004; CHESKIN; MILLER, 2001; WALKER; HALL; HURST 1990).

Na diarreia motora, o aumento da motilidade é provocado por condições que aumentam o trânsito intestinal e promove menor tempo de digestão e absorção de água e nutrientes, tais como o hipertireoidismo, o uso de fármacos como a neostigmina e procinéticos, a síndrome do intestino irritável, certas toxinas e pós-cirurgias, como vagotomia e gastrectomia (KENT; BANKS, 2010). Por outro lado, a diminuição do peristaltismo

ocasionada, por exemplo, pelo uso de opiáceos e anticolinérgicos também pode causar diarreia, em virtude do crescimento bacteriano intenso no intestino delgado (CHESKIN; MILLER, 2001).

A diarreia inflamatória ou exsudativa ocorre devido a lesões inflamatórias da mucosa do intestino delgado ou grosso, e está associada à diminuição da absorção e aumento da secreção, acompanhada de muco, proteínas séricas e sangue. Os patógenos associados à diarreia inflamatória incluem: *E. coli* enteroinvasiva, *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Yersinia*, *Entamoeba histolytica*, *Schistosoma mansoni* e *Strongyloides stercoralis*. Ademais, as diarreias inflamatórias podem ser causadas por doenças inflamatórias intestinais (Doença de Crohn e Colite Ulcerativa Crônica), neoplasias intestinais (HAMMER; MCPHEE, 2016) e drogas como, agentes imunossupressores, quimioterápicos, alguns antibióticos e anti-inflamatórios (ABRAHAM; SELLIN, 2007).

Do ponto de vista clínico, a diarreia pode ser classificada como aguda quando a duração for menor que duas semanas; persistente, tem duração de duas a quatro semanas; e crônica quando durar mais que quatro semanas (TERRIN; CANANI, 2011). A diarreia aguda é geralmente causada por protozoários (*Cyclospora*, *Cryptosporidium*, *Microsporidium*, *Isoospora belli*, *Giardia lamblia*, *E. histolytica*), bactérias (*Campylobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli*, *V. cholerae*, *Clostridium difficile*, *Staphylococcus*, *Aeromonas*, *Yersinia*), vírus (Rotavírus e Adenovírus) e causas não infecciosas, como antibióticos e antiácidos contendo magnésio (LEE, 2015; BARBUTI, 2008).

A diarreia persistente pode ser definida como uma condição clínica de causa presumivelmente infecciosa, que se inicia como um episódio agudo e se prolonga de forma não usual, e é responsável por altas taxas de mortalidade, morbidade e desnutrição, especialmente em crianças menores de 5 anos de idade, geralmente associada à *G. lamblia*, *Cryptosporidium* ou *E. coli*, mas pode ocorrer também devido ao uso de antibióticos (ANDRADE; MOREIRA; NETO, 2000).

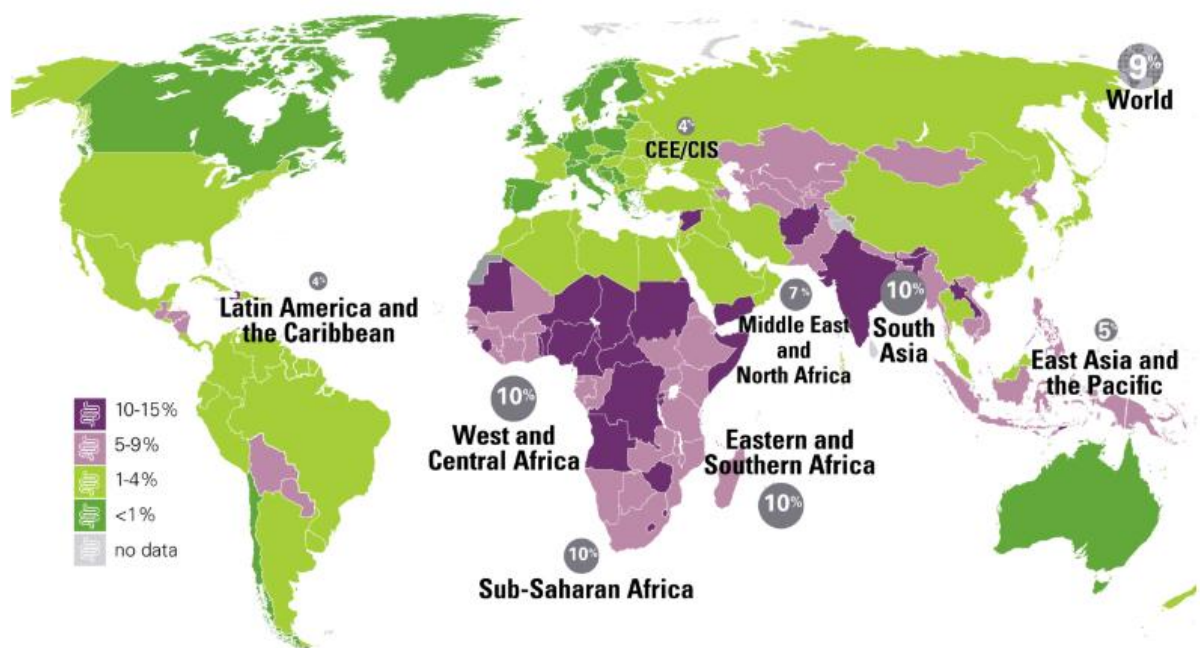
Por outro lado, a diarreia crônica é geralmente relacionada a uma desordem funcional, como a síndrome do intestino irritável, síndrome de má-absorção e imunodeficiência. Ademais, infecção por *G. lamblia*, *E. histolytica* e *Cryptosporidium* também causam diarreia crônica (LEE, 2015; THAPAR; SANDERSON, 2004), sendo um problema comum em indivíduos com AIDS. Desse modo, nas fases iniciais, os agentes causadores da diarreia são os mesmos da população não infectada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV),

entretanto, com o agravamento da doença, a diarreia passa a ser causada por agentes oportunistas (MANZIONE et al., 2003). Assim, em pacientes imunodeprimidos, o próprio vírus e medicamentos usados para o tratamento podem acarretar efeitos sobre a mucosa, causando desordens da motilidade e da função intestinal (BLANSHARD; GAZZARD, 1995).

3.2.2. EPIDEMIOLOGIA

As diarreias são importantes causas de morbidade e mortalidade infantil, representam cerca de 9% de todas as mortes em crianças com menos de 5 anos de idade no mundo em 2015 (Figura 3). Isso significa que mais de 1.400 crianças morrem por dia, ou cerca de 526.000 por ano. A maioria dessas mortes ocorre no sul da Ásia e África (UNICEF, 2016).

Figura 3. Percentual de óbitos atribuídos à diarreia (2015).



Fonte: WHO; MCEE apud UNICEF, 2016.

Apesar desses números ainda alarmantes, nos últimos anos, a taxa de mortalidade por diarreias no mundo vem diminuindo. De 2000 a 2015, o número anual total de mortes em crianças, com menos de 5 anos de idade, diminuiu mais de 50%, passou de aproximadamente 1,2 milhões para meio milhão. Contudo, um número maior de crianças poderiam ser salvas por meio de intervenções básicas, pois cerca de 60% das mortes por diarreia são atribuídas à falta de água potável, higiene e saneamento (UNICEF, 2016).

Os principais agentes patogênicos causadores de diarreias são transmitidos pela via fecal-oral, por meio do consumo de alimentos e água contaminados (BYERS; GUERRANT; FARR, 2001). Aproximadamente 2,5 bilhões de cidadãos do planeta não possuem saneamento básico. Em países com economias em rápido crescimento, existe um grande número de pessoas que continuam a fazer suas necessidades fisiológicas a céu aberto, 626 milhões de pessoas na Índia, 14 milhões na China e 7,2 milhões no Brasil (UNICEF, 2015).

O Brasil é um dos países que ainda apresenta incidência elevada de casos de diarreia. Em 2010, a mortalidade em crianças menores de 5 anos foi de 18,6 óbitos por 1.000 nascidos vivos (BRASIL, 2011). De acordo com o sistema de vigilância do Ministério da Saúde, no Brasil, as diarreias possuem maior prevalência nas cidades da região nordeste. Em 2011, foram notificados 756 óbitos por diarreia aguda, sendo 354 destes na região nordeste e 20 casos no Piauí (BRASIL, 2011). No ano de 2013, a Secretaria de Saúde do Piauí registrou oito surtos de diarreia, cerca de 100 mil casos foram notificados, com 126 óbitos, em 2014, os números continuaram alarmantes, sendo registrados 7.279 casos de diarreia no estado, com 105 óbitos (SESAPI, 2014).

3.2.3. PREVENÇÃO, DIAGNÓSTICO E MANEJO

De acordo com o relatório lançado pela UNICEF e OMS, são elementos importantes para a prevenção da diarreia: vacinas contra rotavirus e sarampo; aleitamento materno imediato e exclusivo; suplementação com vitamina A; lavagem das mãos com água e sabão; melhoria da qualidade da água e promoção do saneamento básico nas comunidades (UNICEF; WHO, 2009). Essas medidas podem contribuir para a redução da morbidade e mortalidade, pois essa condição clínica é causada principalmente por bactérias, vírus e parasitas transmitidos por meio da água e alimentos contaminados (UNICEF, 2015; GURGEL, 2001).

Em geral, o diagnóstico das diarreias é clínico, dado basicamente através da anamnese, relato de alteração do hábito intestinal, como o aumento do número de evacuações, peso ou diminuição da consistência fecal, e pelo exame físico, que pode revelar sinais de desidratação e comprometimento do estado geral (BARBUTI, 2008).

A cultura de fezes para patógenos específicos como *Salmonella*, *Shigella* e *Campylobacter* é frequentemente considerada apropriada para auxiliar a escolha do tratamento, mas seus benefícios são questionados (GUERRANT et al., 2001). Os exames complementares como hemograma, sorologia, parasitológico, pesquisa de toxinas e de

leucócitos fecais, dosagem de sódio, potássio, magnésio e gasometria podem ajudar no diagnóstico do agente etiológico, além de auxiliar no tratamento dos distúrbios hidroeletrólíticos e orientação terapêutica (BARBUTI, 2008).

Muitos pacientes tem diarreia com início súbito e auto-limitada, logo, não necessitam de tratamento. No entanto, casos acompanhados de desidratação e dos desequilíbrios eletrólíticos acarretam riscos graves, particularmente em lactentes, crianças e idosos (MANATSATHIT et al., 2002).

Desse modo, o desenvolvimento da Solução e Reidratação Oral (SRO) representou um marco no tratamento das diarreias, podendo ser considerado o fator determinante da redução da mortalidade infantil (HIRSCHHORN, 1980). No entanto, somente nas últimas décadas, as bases científicas dessa terapêutica começaram a ser elucidadas. O elemento chave para o desenvolvimento da SRO está associado à proteína SGTL-1, um transportador ativo de glicose dependente de sódio, que está presente na membrana apical dos enterócitos e auxilia o transporte de água (ARAUJO; MARTEL, 2009). Assim, a SRO consegue evitar e curar, de forma eficiente a desidratação, no entanto, não é capaz de reduzir a duração e gravidade da diarreia (BARDHAN, 2007).

Apesar do sucesso inicial, foi observada uma mudança no cenário mundial caracterizada por uma menor ocorrência de diarreia por cólera e maior ocorrência de diarreias virais, desse modo, surgiu uma preocupação em relação à concentração de sódio da SRO, que seria muito elevada em relação às perdas observadas nas diarreias virais (DUGGAN et al., 2004).

Em 2004, a OMS atualizou suas diretrizes de gerenciamento de diarreia infantil com uma nova formulação dessa terapêutica. A SRO de baixa osmolaridade revelou que a redução no conteúdo de sódio (90 mEq para 75 mEq) e a redução do conteúdo de glicose (111 mOsm/l para 75 mOsm/l), com consequente redução da osmolaridade total (311 mOsm/l para 245 mOsm/l), diminuiu os vômitos, as evacuações e a probabilidade de hipernatremia, além de reduzir a necessidade de hidratação intravenosa, quando comparada com a SRO convencional (BINDER et al., 2009).

A SRO de baixa osmolaridade contém cloreto de sódio, glicose, cloreto de potássio e citrato trissódico. O sódio e potássio são essenciais para a restauração do equilíbrio eletrólítico, a glicose auxilia a absorção de sódio pelos enterócitos e o citrato corrige a acidose resultante da desidratação e da diarreia. Contudo, a SRO é contraindicada no manejo inicial

de casos de desidratação grave ou vômitos incontroláveis, pacientes em choque (pressão arterial muito baixa), pacientes incapazes de beber líquidos ou portadores de outras doenças graves, pois, nesses casos é imprescindível a infusão rápida do volume de reposição (BRANDT; DE CASTRO; DA SILVA, 2015).

Estudos mostram que a suplementação com o zinco é capaz de reduzir de forma significativa a severidade, a duração e mortalidade da diarreia em crianças (YAKOOB et al., 2011; HAIDER; BHUTTA, 2009). Segundo Folwaczny (1997), a suplementação com o zinco acelera a regeneração da mucosa, aumenta os níveis de enzimas da borda em escova, aumenta a imunidade celular e o número de anticorpos.

3.3. TRATAMENTO FARMACOLÓGICO

O uso de antidiarreicos é frequentemente contraindicado, em especial nas fases iniciais da afecção, pois a diarreia pode ser encarada como uma defesa do organismo para a eliminação de toxinas (BHATNAGAR et al., 2007; DE LUCIA et al., 2007). Em geral, os fármacos antidiarreicos inespecíficos não atuam nos mecanismos fisiopatológicos subjacentes responsáveis pela diarreia, assim, o tratamento farmacológico inespecífico da diarreia deve ser reservado para os pacientes com sintomas persistentes ou significativos. Contudo, sempre que uma etiologia de base puder ser determinada, um tratamento específico deve ser instituído, quando apropriado (SCHILLER; SELLIN, 2010).

3.3.1. AGENTES ANTIMOTILIDADE

3.3.1.1. OPIOIDES

Os opioides são amplamente usados no tratamento da diarreia e atuam por mecanismos diferentes, mediados principalmente pelos receptores opioides (μ ou δ) presentes nos nervos entéricos, nas células epiteliais e músculos. Esses mecanismos incluem alterações da motilidade intestinal (receptores μ) ou da absorção (receptores μ ou δ). Os antidiarreicos utilizados comumente (difenoxilato e loperamida) atuam, principalmente, via receptores opioides μ periféricos (KHANSARI; SOHRABI; ZAMANI, 2013).

A loperamida é um derivado butiramídico da piperidina usada na forma de cloridrato, e pode ser encontrada como Closecs®, Diarresec®, Imodium®, Imosec®, cujos efeitos são atribuídos em parte a sua ação como agonista de receptores opioides do tipo μ do trato gastrointestinal (AKEL; BEKHEIT, 2017; REGNARD et al., 2011). O efeito celular desses

receptores, ligados a proteínas G inibitórias, depende de múltiplas vias de transdução, como a ativação dos canais de potássio e hiperpolarização da membrana, inibição dos canais de cálcio e inativação da calmodulina, redução da produção de AMPc e da liberação de neurotransmissores como a acetilcolina. Desse modo, a loperamida diminui o peristaltismo e aumenta a reabsorção intestinal (EGGLESTON; NACCA; MARRAFFA, 2015).

Além desses efeitos, a loperamida aumenta o tônus do esfíncter anal e reduz a sensação de urgência e incontinência anal (EGGLESTON; CLARK; MARRAFFA, 2017). A loperamida apresenta ainda atividade antissecretora na diarreia induzida pela toxina da cólera e por toxinas produzidas por *E. coli*. Essa atividade ocorre devido a ação em receptores ligados a proteína G, e por impedir o aumento do AMPc, que é estimulado por essas toxinas (AKEL; BEKHEIT, 2017; REGNARD et al., 2011).

Esse fármaco tem sido usado como agente coadjuvante no tratamento de quase todos os tipos de diarreias crônicas e apresenta poucos efeitos adversos, entretanto, em doses excessivas pode causar depressão do SNC, principalmente em crianças e íleo paralítico (BLUSH; MATZO, 2012).

O cloridrato de difenoxilato e sulfato de atropina (Lomotil® e outros) é a segunda linha de agentes recomendados para adultos, seu mecanismo de ação envolve propriedades opioides e anticolinérgicas, que auxiliam a diminuição da motilidade intestinal (BLUSH; MATZO, 2012). Contudo, em altas doses, esses fármacos causam efeitos no SNC e efeitos anticolinérgicos, tais como boca seca, visão borrada, entre outros (BLUSH; MATZO, 2012; CORBETT; PALMER; HOLDSWORTH, 1980).

Agentes antimotilidade como codeína, morfina e preparações contendo extrato do ópio (elixir paregórico) podem também gerar efeitos no SNC. Além disso, a tolerância às propriedades analgésicas do ópio ou agonistas de receptores opioides é frequente, todavia, é rara em relação aos efeitos antidiarreicos (KOLBOW et al., 2016). Desse modo, embora os opioides exerçam efeitos antidiarreicos, a ação sobre o SNC limita a utilização da maioria desses fármacos.

3.3.1.2. ANTAGONISTAS DE RECEPTORES MUSCARÍNICOS

Antagonistas de receptores muscarínicos são drogas antimotilidade muito utilizadas, dentre os mais conhecidos estão atropina (Hiosciamina®), a escopolamina (Buscopan®) e a dicitlomina (Bentyl®) (LOCHNER; THOMPSON, 2016; PAGE; DIRNBERGER, 1981).

No músculo liso intestinal, a interação de agonistas como a acetilcolina com receptores muscarínicos do tipo M₃ ligados a proteína G, promove a despolarização da célula, ativa as fosfolipases e libera o inositol 1,4,5 trifosfato (IP₃) e o diacilglicerol (DAG). O IP₃ libera cálcio do retículo sarcoplasmático e o DAG ativa a proteína quinase C, aumentando a condutância dos canais de cálcio transmembrana. Em seguida, o cálcio intracelular ao ligar-se à calmodulina, altera a sua conformação, permitindo a interação entre a actina e a miosina, e promove o deslizamento de um filamento sobre o outro que resulta na contração muscular (SUGURO et al., 2010). Entretanto, a ativação dessa via e, conseqüentemente, a contração muscular só ocorre mediante a ligação de agonistas aos seus respectivos receptores.

Desse modo, antagonistas colinérgicos promovem o relaxamento da musculatura lisa mediante o bloqueio da ligação da acetilcolina ao receptor muscarínico, impedindo a despolarização do músculo liso (CAULFIELD, 1993). Contudo, os antagonistas colinérgicos podem atuar em outros órgãos do corpo através da interação com receptores muscarínicos, resultando em efeitos adversos como boca seca, taquicardia e náusea (BORRELLI et al., 2009).

3.3.1.3. AGONISTAS DOS RECEPTORES α_2 – ADRENÉRGICO

Os agonistas dos receptores α_2 – adrenérgico, como a clonidina, podem interagir com receptores específicos dos neurônios entéricos e dos enterócitos, inibindo a secreção e o peristaltismo e aumentando a absorção intestinal. Desse modo, a clonidina é útil em pacientes diabéticos com diarreia crônica, nos quais a neuropatia autônoma pode levar a perda da inervação noradrenérgica, além disso, esse fármaco tem sido útil aos pacientes com diarreia causada pela abstinência opioide. Por outro lado, apresenta efeitos adversos como hipotensão, depressão e sensação de fadiga que podem limitar as doses usadas pelos pacientes suscetíveis (CAMILLERI et al., 2003).

3.3.2. AGENTES ANTISSECRETORES

As encefalinas atuam como neurotransmissores entéricos, que inibem a secreção intestinal, esses opioides endógenos inibem diretamente a produção de AMPc por meio da ligação a receptores δ opioides nos enterócitos (NANO et al., 2000). As encefalinas são rapidamente degradadas pela metaloproteína ligadas à membrana, encefalinase, encontradas no trato gastrointestinal. O racecadotril (Tiorfan®) é um inibidor de encefalinase,

originalmente conhecido como acetorfano, e foi desenvolvido para o tratamento da diarreia aguda. Segundo Hinterleitner et al (1997), o racecadotril previne a secreção de eletrólitos e água induzida pela toxina da cólera no jejuno em humanos.

Embora a eficácia do racecadotril tenha sido igual à do tratamento com loperamida, a incidência de constipação é significativamente menor (12,9% vs 29%) (WANG; SHIEH; LIAO, 2005). Além disso, o racecadotril também tem sido eficaz no tratamento da diarreia em crianças, com redução na produção de fezes e também redução na duração em casos de diarreia aguda, entretanto, esse fármaco não paralisa a motilidade intestinal (SZAJEWSKA et al., 2007).

3.3.3. ANTIBIÓTICOS

Os antibióticos são frequentemente recomendados para pacientes que apresentam diarreia severa associada à febre, pacientes imunossuprimidos, com neoplasias malignas e casos relacionados a parasitas ou infecções bacterianas graves (LEE, 2015). A escolha de fármacos desse tipo deve considerar o aumento da incidência de resistência aos antibióticos e a modificação da flora bacteriana normal, um importante mecanismo de proteção (GUERRANT et al., 2001).

A terapia com antibióticos é guiada por meio de testes de sensibilidade, mas geralmente é iniciada com fluoroquinolonas por causa da resistência generalizada a ampicilina, sulfonamidas, tetraciclina, cloranfenicol e ciprofloxacina (ZHANG et al., 2015).

3.3.4. PROBIÓTICOS

O trato gastrointestinal contém ampla flora comensal necessária para a manutenção de várias funções. Desse modo, alterações no equilíbrio ou composição dessa flora são responsáveis pelas diarreias associadas ao uso de antibióticos e possivelmente outras doenças. Assim, a administração de probióticos, ou seja, micro-organismos não patogênicos, para colonizar o intestino é uma área sob intensa investigação (GUANDALINI, 2012).

A eficácia dos probióticos depende da cepa, dose e viabilidade do micro-organismo contido na preparação. Probióticos contendo *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, *Streptococcus* e *Saccharomyces boulardii* mostraram benefícios nas diarreias agudas infecciosas e associadas a antibióticos (PARKES; SANDERSON; WHELAN, 2009).

Probióticos contendo *S.boulevardii* foram associados à prevenção da diarreia (SZAJEWSKA; KOLODZIEJ, 2015; CREMONINI et al., 2002), por outro lado, os efeitos benéficos da formulação contendo *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, na diarreia associada a antibióticos ou ao *Clostridium difficile*, não foram evidenciados (ALLEN et al., 2013). Contudo, de modo geral, tem sido demonstrado que a ingestão de probióticos diminui a incidência e a duração das diarreias (ALLEN et al., 2013).

No estudo realizado com células epiteliais humanas foi observado que cepas de *Lactobacillus helveticus* e *Lactobacillus rhamnosus* bloqueiam a adesão de toxinas produzidas por *E. coli* (toxina Shiga) e *E. coli* enteropatogênica (EPEC) (SHERMAN et al., 2005). A eficácia de *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus casei*, e de formulações probióticas contendo *L. helveticus* e *L. rhamnosus* na prevenção de infecções tem sido atribuída ao aumento a imunidade mediada através da ativação de macrófagos periféricos (ISHIDA-FUJII et al., 2007; JOHNSON-HENRY et al., 2005).

Em geral, os probióticos melhoram a saúde intestinal através da estimulação da produção de substâncias bactericidas, de mucina (glicoproteína), que têm a função de proteger e lubrificar membranas mucosas, facilitam a digestão de alimentos, competem com patógenos pelos nutrientes e alteram o pH local criando um ambiente desfavorável para os patógenos (WGO, 2011). Além disso, os probióticos também têm benefícios imunológicos extremamente relevantes, ativam macrófagos locais, estimulam a apresentação dos antígenos para os linfócitos B e aumentam a produção da imunoglobulina A (IgA) (WGO, 2011).

Desse modo, os medicamentos destinados ao tratamento da diarreia disponíveis atualmente, podem atuar sobre os micro-organismos ou trato intestinal, diminuindo a motilidade, secreção ou alterando a sua flora (GOODMAN; GILMAN, 2012). Não obstante, a farmacoterapia dessa disfunção permanece limitada apesar dos avanços no entendimento de seus mecanismos celulares (KENT; BANKS, 2010).

3.4. USO DE PRODUTOS NATURAIS PARA O TRATAMENTO DAS DIARREIAS

Os produtos naturais continuam sendo utilizados como fontes valiosas para o desenvolvimento de novos compostos com potencial de aplicação em várias áreas (JIN et al., 2016). Em todo o mundo, existe um número elevado de fitoterápicos considerados eficazes para o tratamento da diarreia, no entanto, os dados científicos que confirmam a eficácia desses fitofármacos são escassos ou inconclusivos (MANATSATHIT et al., 2002).

A propriedade antidiarreica de produtos naturais pode ser comprovada por meio de diferentes mecanismos, incluindo a estimulação da absorção de água e/ou redução da secreção de eletrólitos; modificação da atividade da Na^+/K^+ ATPase; inibição do trânsito gastrointestinal; mudança na atividade de enzimas e sistemas de neurotransmissores; interação com canais de Ca^+ ; modulação do metabolismo ácido araquidônico via inibição da ciclooxigenase (COX) e lipo-oxigenase; alteração da disponibilidade de Ca^{2+} em etapas envolvidas na excitação-contração ou inibição de agonistas indutores de contrações (PALOMBO, 2006). Além desses mecanismos, a presença de substâncias químicas que exercem ação adstringente, antimicrobiana e/ou antiparasitária também auxilia o controle de certos tipos de diarreia (TIAN et al., 2009; PANIZI et al., 2002).

Estudos têm demonstrado a atividade antiespasmódica induzida por diversos extratos de plantas medicinais, sendo o relaxamento do músculo liso intestinal mediado pelo bloqueio dos canais de Ca^{2+} ou pela abertura dos canais de K^+ (MEHMOOD et al., 2015). O extrato metanólico de *Matricaria chamomilla* L., também conhecida como camomila, possui atividade antidiarreica, antissecretora e antiespasmódica mediada, predominantemente, através da ativação dos canais de K^+ , provendo a hiperpolarização e efeito antagônico na corrente de Ca^{2+} (MEHMOOD et al., 2015).

Do mesmo modo, foi demonstrada a influência do extrato aquoso de folhas de *Psidium guajava* (goiabeira) (OJEWOLE; AWE; CHIWORORO, 2008), *Stachytarpheta cayenensis* (gervão), *Eugenia unifora* (pitangueira), *Aster squamatus* (Zé-da-silva), *Polygonum punctatum* (pimenta d'água) (ALMEIDA et al, 1995) e *Myracrodruon urundeuva* (aroeira) sobre a motilidade gastrointestinal (CRUZ, 1982).

Por outro lado, o alcaloide vegetal Berberina, produzido por vários gêneros das famílias Ranunculaceae e Berberidaceae, muito utilizado na China e Índia, parece exercer efeitos antidiarreicos por meio da sua capacidade de retardar o peristaltismo e inibir a secreção intestinal, além de atuar como antimicrobiano (GOODMAN; GILMAN, 2012; RABBANI et al., 1987).

Muitos estudos têm proposto a aplicação de flavonoides para o tratamento de enfermidades inflamatórias intestinais como a doença de Crohn e colite ulcerosa (GALVEZ et al., 2000; KIM et al., 1999). Os flavonoides são compostos de baixo peso molecular amplamente distribuídos no reino vegetal, que podem ter grande utilidade em diarreia aguda e crônica, por reduzir os movimentos peristálticos e a secreção intestinal (DICARLO et al.,

1994; ALMEIDA et al., 1995), podendo também ser benéfico na redução de danos, proporcionando proteção contra o stress oxidativo e preservando a mucosa intestinal (BALLESTER et al., 2006).

Outro fitoquímico com atividade antidiarreica é o tanino, substâncias polifenólicas, solúveis em água, com capacidade de precipitar proteínas. Quando precipitam as proteínas, os taninos formam uma capa que protege a mucosa intestinal e reduz a secreção de água e eletrólitos (TIAN et al., 2009; TRIPATHI, 1994). Ademais, a formação dessa camada na mucosa, também inibe o desenvolvimento de micro-organismos, por meio da ação antisséptica, contribuindo para o tratamento da diarreia (TIAN et al., 2009). Recentemente, a eficácia da goma extraída do exsudato da *Anacardium occidentale L.* no tratamento da diarreia foi observada em modelos experimentais. Esse heteropolissacarídeo inibe a motilidade intestinal por meio da interação com receptores opioides e colinérgicos e, assim, reduz o acúmulo de fluidos, além de inibir a secreção de Cl^- e água no lúmen intestinal (ARAÚJO et al 2015).

3.5. MODELOS EXPERIMENTAIS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIDIARREICA

Vários modelos têm sido utilizados para avaliar a atividade antidiarreica de uma substância, entre esses, a diarreia induzida pelo óleo de rícino (ISLAM et al., 2013), um laxante extraído a partir da semente de *Ricinus communis* (Euphorbiaceae), é um modelo amplamente usado para a investigação de substâncias com propriedades antidiarreicas (GUTIÉRREZ et al., 2014; TADESSE et al., 2014).

Após a ingestão oral, o óleo de rícino é emulsificado no intestino pela bile e hidrolisado pelas lípases pancreáticas, que liberam o ácido ricinoleico (ácido 12 - hidróxi-9-cis-octadecenoico), promovendo uma irritação na mucosa e a produção de prostaglandinas (GALVEZ et al., 1993), histamina (CAPASSO et al., 1986), fator de ativação plaquetária (PINTO et al., 1992) e óxido nítrico (MASCOLO et al., 1993). O ácido ricinoleico também ativa a adenilato ciclase, promovendo o aumento de AMPc na mucosa e altera o transporte de eletrólitos, água e os movimentos peristálticos do intestino (MASCOLO et al., 1993; SIMON; KATHER, 1980).

Após a indução da diarreia com o óleo de rícino, vários parâmetros podem ser avaliados, tais como: peso total de fezes sólidas e líquidas, a severidade da diarreia, o percentual de fezes líquidas e da inibição da diarreia (AWOUTERS et al., 1978).

A atividade antidiarreica de uma substância pode ser investigada por meio do modelo de diarreia aguda induzida por prostaglandina E tipo 2 (PGE₂) (RIVIERE et al., 1991), que é formada a partir do ácido araquidônico por ação das COX. A PGE₂ aumenta a atividade da adenilato ciclase intestinal, elevando os níveis de AMPc, que modifica o fluxo de Na⁺ e Cl⁻, aumenta a secreção (BUKHAVE; RASK-MADSEN., 1980) e os movimentos intestinais (FUJII et al., 2016; BURAKOFF; PERCY, 1992).

A diarreia do tipo osmótica pode ser induzida por purgativos ou cartáticos salinos, como sulfato de magnésio ou hidróxido de magnésio (leite de magnésia®) (CHUNFANG et al., 2014). A presença de substâncias osmoticamente ativas no trato gastrointestinal promove a distensão do cólon, que estimula a atividade motora e diminui a absorção intestinal. No entanto, como desvantagem, esse modelo aumenta o volume do conteúdo intestinal de forma lenta e necessita de aumento da oferta de água (ISLAM et al., 2013; DANTAS, 2004).

Para investigar diretamente a influência de uma substância sobre a motilidade, pode ser utilizado o modelo de trânsito intestinal, que usa grupos tratados com drogas que tem mecanismos de ação conhecidos, como: naloxona e/ou morfina, que interage com receptores opioides; verapamil, com canais de cálcio do tipo L; propranolol, com receptores β-adrenérgicos; ioimbina, com receptores α-2 adrenérgicos (CHENG et al., 2016; GURGEL et al., 2001; DICARLO et al., 1994), em seguida, é comparada a distância percorrida por um marcador não absorvível entre os grupos, afim de caracterizar o mecanismo de ação de uma substância desconhecida (DE SALES et al., 2015).

Do mesmo modo, no modelo de trânsito gastrointestinal estimulado pela fisostigmina, um inibidor da colinesterase, pode ser utilizado para identificar uma possível atividade anticolinérgica na inibição do trânsito gastrointestinal de determinada substância (GURGEL et al., 2001).

O efeito de substâncias sobre a motilidade pode ser avaliado ainda por meio de contrações induzidas por agonistas, em jejuno isolado *in vitro*. Para a realização desse modelo, uma porção do jejuno é montada e feito o registro das respostas contráteis a acetilcolina, cloreto de bário, 5-HT, antes e após a incubação com a substância teste (ABDULLAHI et al., 2001; MURUGESAN et al., 2000).

Contudo, apenas o modelo do esvaziamento gástrico permite identificar se o efeito de uma substância sobre a motilidade do trato gastrointestinal ocorre em nível de estômago e/ou intestino, esse método avalia a porcentagem de retenção de um marcador não absorvível por segmento do tubo digestivo (MEDEIROS et al., 2012).

Para determinar se a atividade antidiarreica de uma substância também está associada a uma redução de fluidos intestinais, indicando indiretamente uma atividade antissecretora, é utilizado modelo de *enteropooling*, nesse modelo, o fluido intestinal pode ser quantificado com o auxílio de uma proveta e é analisada a capacidade de diminuição de secreção do fluido intestinal (ROBERT et al., 1976).

Além disso, tem sido feitas tentativas de simular estados patológicos através da utilização de enterotoxinas (MOURAD, 2004). Os modelos experimentais com a toxina da cólera (TC) ajudaram a esclarecer os processos de absorção no intestino, os mecanismos de perda de eletrólitos e impulsionaram o desenvolvimento de SRO. Desse modo, a TC tornou-se uma ferramenta amplamente utilizada para elucidar os aspectos importantes da biologia celular, por exemplo, dos receptores de membrana, do sistema de AMPc, das proteínas G, bem como dos mecanismos normais e patológicos de transporte de íons (PETRI JUNIOR et al., 2008).

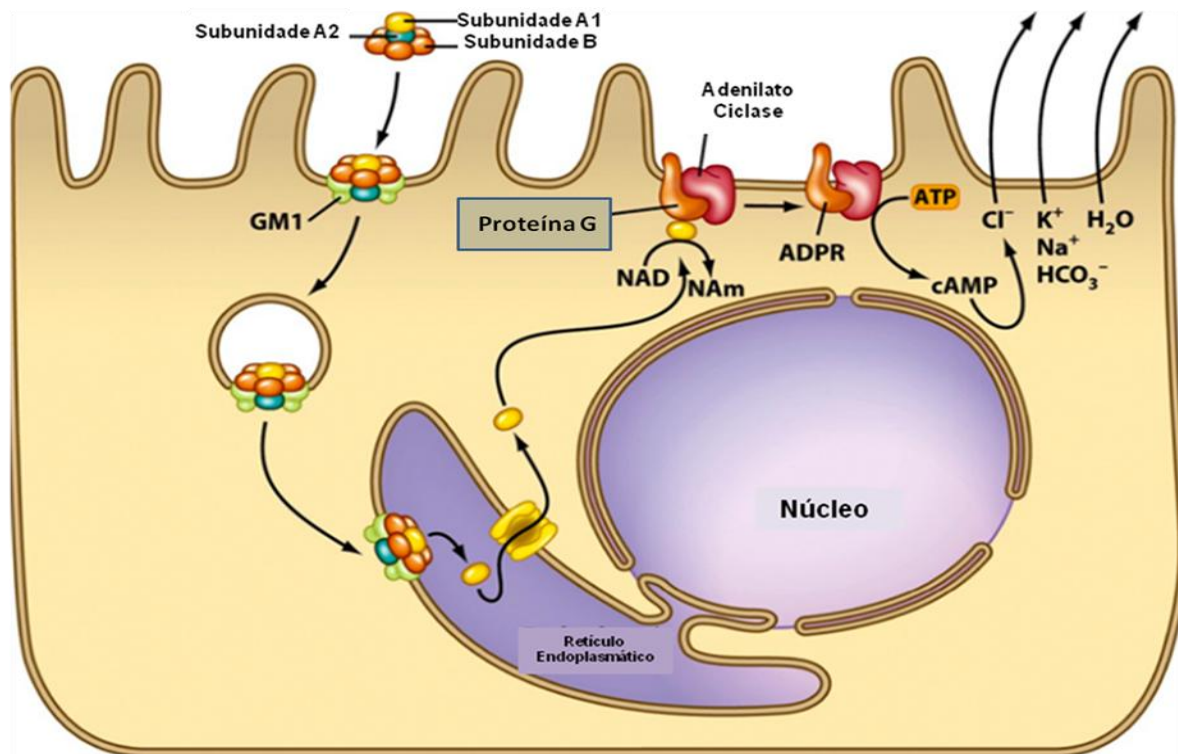
A TC é formada pela subunidade ativa A (A1 e A2), que está covalentemente ligada a 5 subunidades B, essa última forma um estrutura em anel que tem a capacidade de se ligar a receptores monossialogangliosídeo (GM1), localizados na superfície dos enterócitos (BALDAUF et al., 2015).

A ligação da toxina ao GM1 promove a sua internalização por endocitose, em seguida, no interior da célula as subunidades que compõem a TC se dissociam. A subunidade A tem atividade difosfato de adenosina ribosiltransferase e interage com a proteína de membrana Gs que regula a adenilato ciclase. O resultado dessa interação aumenta os níveis de AMPc, levando a ativação da proteína cinase dependente de AMPc (PKA), causando a fosforilação e abertura dos CFTR da membrana apical dos enterócitos. A secreção de Cl⁻ é acompanhada pela secreção de Na⁺ e água. Assim, o volume do líquido secretado para o lúmen intestinal sobrepuja os mecanismos absorptivos do intestino delgado e colon, levando a diarreia maciça (LIMA; FONTELES, 2014; DUBREUIL, 2013; MATHAN, 1998). O *V.cholerae* ou vibrião colérico, a bactéria produtora da TC não é invasiva, contudo, permanece no lúmen do

intestino delgado liberando sua enterotoxina durante a progressão da doença (MATHAN, 1998).

A TC é funcional e estruturalmente similar à toxina termo lábil (TL) produzida pela *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) (Figura 4) (SIXMA et al., 1992).

Figura 4. Enterotoxina e mecanismo patológico de hipersecreção de eletrólitos e água. Após a ligação da enterotoxina a receptores presentes na superfície dos enterócitos (GM1), a toxina é internalizada, e em seguida as subunidades se dissociam. Posteriormente, a subunidade A interage com a proteína G e a adenilato ciclase, e induz a secreção de fluidos.



Fonte: Adaptado de SLONCZEWSKI; FOSTER, 2009.

A TL, assim como a TC, é formada por 2 subunidade A e 5 subunidades B, essenciais para a ligação da toxina aos receptores GM1 na superfície dos enterócitos. Após a ligação ao receptor GM1, a TL promove a saída da água, causando a diarreia, por meio de mudança no gradiente osmótico envolvendo a proteína G, adenilato ciclase, AMPc, CFTR e outros canais iônicos, causando secreção de cloro e bicarbonato nas criptas, bloqueando assim a absorção de Na⁺ e Cl⁻ nas vilosidades, do mesmo modo que a TC (DUBREUIL, 2013; LIMA; FONTELES, 2014).

Entretanto, ao contrário da TC, a TL é encontrada no espaço periplasmático da bactéria e é expulsa quando exposta a sais biliares no intestino delgado (MAINIL, 2013). A

TL é uma causa importante da diarreia dos viajantes, enquanto a cólera é endêmica em muitas regiões do mundo e tem sido importante preocupação para pessoas que habitam essas áreas, assim como para viajantes dessas regiões (DUBREUIL, 2013). Muitos estudos têm demonstrado que a ligação da TL ao GM1 é inibida pela galactose (BECKER; WIDJAJA-GREEFKES; VAN WIKSELAAR, 2010).

Após a fase de identificação de atividade biológica e entendimento dos mecanismos de ação, é necessário a realização de estudos de toxicologia pré-clínica, afim de indicar o grau de confiança depositado em um medicamento a ser administrado na espécie humana, independente da sua origem (BERKOWITZ; KATZUNG, 2003).

3.6. TOXICOLOGIA DE PRODUTOS NATURAIS

O número de pessoas que fazem o uso de plantas para o tratamento de doenças sem conhecer os seus riscos é muito elevado, esse fato, torna os estudos toxicológicos e farmacológicos pré-clínicos e clínicos indispensáveis à proteção da saúde. A toxicidade de plantas medicinais e fitoterápicos pode parecer trivial quando comparada a dos medicamentos usados nos tratamentos convencionais, contudo, representa um problema sério de saúde pública (EFFERTH; KAINA, 2011).

Nesse sentido, os ensaios não clínicos e clínicos de produtos candidatos a medicamento fitoterápico e/ou fitofármacos devem ser realizados com o sentido de se obter informações que certifiquem a segurança e eficácia (ANVISA, 2014). Em geral, as normas para avaliações toxicológicas de medicamentos são elaboradas por instituições regionais, tais como: a europeia, *Organisation for Economic Cooperation and Development* - OECD, a americana, *Food and Drug Administration* – FDA, e a asiática, Agência Japonesa de Medicamentos e Dispositivos Médicos - PMDA (HANDOO et al., 2012).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é o órgão regulador para registro de medicamentos fitoterápicos de uso humano e determina a realização de estudos de toxicidade tendo como base o “Guia para a Condução de Estudos não Clínicos de Toxicologia e Segurança Farmacológica Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos” (ANVISA, 2013). De acordo com esse guia devem ser realizados testes de toxicidade aguda, testes de toxicidade de doses repetidas (toxicidade subcrônica e crônica), e quando houver

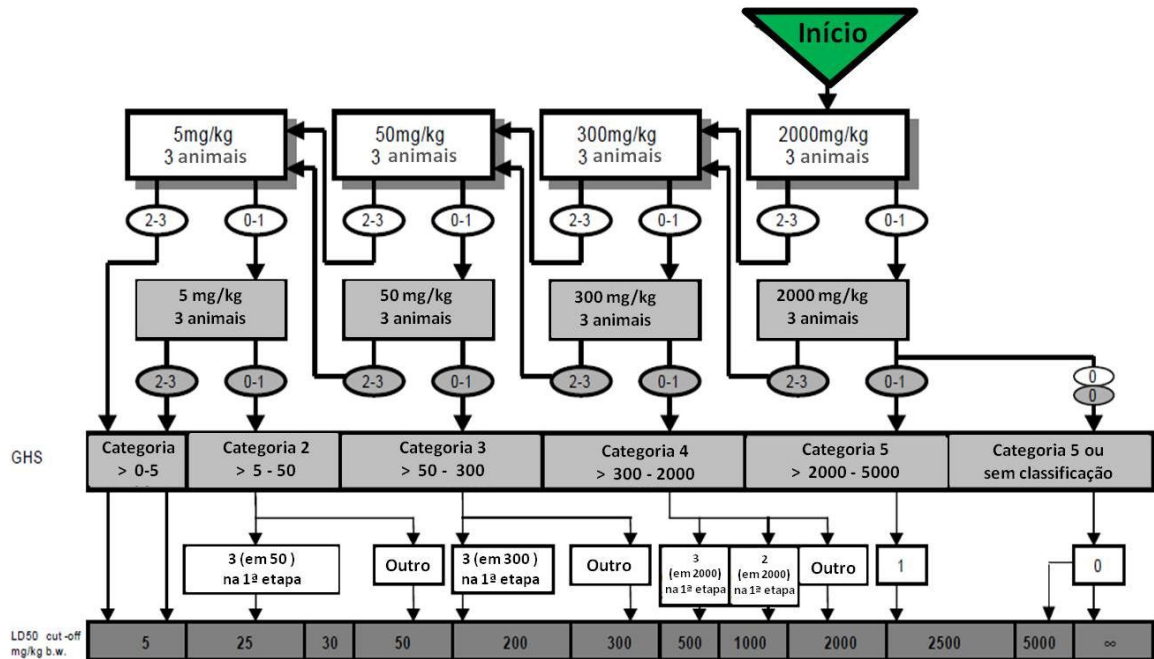
indicação de uso contínuo ou prolongado do medicamento deverão ser realizados testes adicionais, tais como estudo de genotoxicidade e toxicidade reprodutiva (ANVISA, 2013).

Atualmente, entre os métodos validados para avaliar a toxicidade aguda em animais estão: Teste de Dose Fixa (OECD 420), Teste de Toxicidade Aguda de Classe (OECD 423) ou ainda o Teste *Up and Down* (OECD 425) (EPA, 2017; ANVISA, 2014). Em geral, esses métodos utilizam um número menor de animais que o preconizado no método clássico de DL_{50} (dose que mata 50% dos animais) e são capazes de classificar substâncias químicas quanto ao seu potencial de toxicidade aguda, fornecer informações sobre possíveis órgãos alvo e evidenciar sinais de toxicidade aguda (EPA, 2017; ANVISA, 2014; ABREU et al., 2008).

Publicado em 1992, o teste de dose fixa é utilizado para identificar a menor dose que causa toxicidade evidente. Com esse propósito, são estabelecidas doses fixas (5, 50, 300 e 2000 mg/kg, e excepcionalmente, pode-se usar 5000 mg/kg), selecionados 5 animais por dose, e após a exposição à substância investigada o animal é observado por 14 dias quanto a sua sobrevivência e aparecimento de efeitos tóxicos (OECD, 2001).

Em 1996, surgiu o método de toxicidade aguda de classe, o qual foi adotado pela OECD (OECD, 423) e utiliza as mesmas doses do teste de doses fixas, contudo emprega apenas 3 animais por dose (OECD, 2001). O guia OECD 423/2001 (Figura 5) avalia a toxicidade produzida por uma substância teste após a administração, em dose única ou parcelada, em um período não superior a 24 horas, seguida da observação dos animais por 14 dias após a administração. Em geral, esse protocolo permite estimar a DL_{50} , sinais de toxicidade aguda e órgãos alvo. As alterações comportamentais dos animais podem ser avaliadas por meio do *screening hipocrático*, uma ferramenta que considera os seguintes critérios comportamentais: atividade geral, motilidade, frequência cardíaca, piloereção, exoftalmia, lambem patas, coçar focinho, morder cauda, convulsão, ereção da cauda, tremor da cauda, sedação, analgesia, anestesia, perda do reflexo. Além disso, outros possíveis efeitos que podem ser observados como força para agarrar, hipotermia e morte (OECD, 2001; BRITO, 1994).

Figura 5. Fluxograma representando a metodologia seguida para o ensaio de toxicidade aguda de classe (OECD 423).



- 0, 1, 2, 3: número de animais mortos em cada etapa.
- GHS: Sistema de Classificação Mundial Harmonizado (mg/kg de peso corporal).
- ∞: não classificado. Fonte: Adaptado de OEDC (2001).

Em 1998, surgiu o teste “*Up and Down*” (OECD, 425) que observa o padrão de sobrevivência do animal em 48 horas, nesse método a escolha da dose para o próximo animal é feita com base na sobrevivência ou morte do primeiro. Esse método apresenta a desvantagem de necessitar de programas específicos para estabelecer a sequência de doses testadas e fornecer as estimativas finais (OECD, 2008).

Nesse contexto, a escolha da via de administração é mais simples do que das doses a administrar, geralmente a via de administração é a mesma que se pretende utilizar nos ensaios clínicos. Os testes de toxicidade aguda empregam três vias de administração: oral, dérmica e inalatória. Contudo, a via oral é a mais utilizada para a avaliação pré-clínica de novos agentes terapêuticos, por ser a via mais comumente usada para a administração de fármacos (OECD, 2008; OECD, 2001). Além disso, para os testes de toxicidade oral aguda é recomendado a utilização de fêmeas, em virtude da maior suscetibilidade a efeitos tóxicos no gênero decorrente de suas alterações hormonais fisiológicas (HAYES, 2007). Em geral, a escolha do método deve ser feita com base do entendimento claro da proposta científica e quanto a resposta que se quer ser obtida (VALADARES, 2006).

3.7. CONSIDERAÇÕES SOBRE ALGAS MARINHAS E POLISSACARÍDEOS SULFATADOS

Alga é um termo genérico desprovido de significado taxonômico que inclui organismos de linhagens filogenéticas completamente diferentes, incluindo procariontes (cianobactérias ou algas azuis) e eucariotes pertencentes ao reino protista, unicelulares ou pluricelulares e autotróficos, possuidores de clorofila 'a' (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007). Devido à realização da fotossíntese, as algas desempenham um importante papel, sendo responsáveis pela produção de oxigênio e fixação de carbono (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007; PERFEITO et al., 2004).

Apesar de não apresentarem origem filogenética concordante, algumas formas de classificação baseadas em suas características morfológicas e estruturais são utilizadas, uma dessas classificações agrupa as algas de acordo com seu tamanho, sendo divididas em algas microscópicas ou microalgas, e algas macroscópicas ou macroalgas (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001). As macroalgas podem ainda ser classificadas de acordo com a presença de pigmentos acessórios que podem mascarar a presença da clorofila em três grupos: Rhodophyta (algas vermelhas), Phaeophyta (algas pardas) e Chlorophyta (algas verdes) (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001).

O surgimento de novas técnicas com aplicações nas áreas de genômica e filogenia molecular permitiu significativas mudanças na história evolutiva de genes e na taxonomia das algas. Desse modo, baseado na interpretação da sequência de base de DNA dos cloroplastos e de sequências de RNA ribossomal, as algas são classificadas atualmente em Cyanophyta, Glaucophyta, Rhodophyta, Cryptophyta, Phaeophyta, Dinophyta, Haptophyta, Euglenophyta, Chlorophyta e Charophyta (PEREIRA; NETO, 2014).

As algas são encontradas em diversos ambientes (solo, água doce e salgada, por exemplo), sua distribuição está relacionada com a temperatura e salinidade da água, disponibilidade de luz solar, correntes dos oceanos, condições físicas e químicas ambientais (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007). Para sobreviver a um ambiente desfavorável e competitivo, as algas marinhas têm desenvolvido estratégias de defesa que resultam na formação de metabólitos com alto nível de diversidade química e estrutural (PUGLISI et al., 2004). Entre esses compostos, os polissacarídeos vêm se destacando devido a sua abundância, (CHUNG et al., 2010), atividades biológicas com potenciais benéficos para a saúde, e aplicações bastante diversificadas nas áreas de alimento, farmacêutica, biomédica e

biotecnológica (SIMPSON, CAMPBELL, 2015; BONTEN et al., 2015; XIE, WANG, ZHANG, 2015).

A parede celular das algas possuem um componente fibrilar, formador do esqueleto da parede, e um componente amorfo, o qual forma uma matriz na qual o componente fibrilar se encontra embebido, que corresponde aos polissacarídeos muito utilizados comercialmente (KLOAREG; QUATRANO, 1998).

Essas macromoléculas apresentam variações estruturais conforme a classificação das algas, sendo encontradas como fucanas nas algas pardas ou marrons (Phaeophyceae), galactanas nas algas vermelhas (Rhodophyceae) e arabino-galactanas nas algas verdes (Chlorophyceae) (ROCHA et al., 2004; PERCIVAL; MCDOWEL, 1967).

Em geral, os polissacarídeos sulfatados compreendem um grupo complexo de macromoléculas, essa complexidade é devido às múltiplas possibilidades de ligações entre os monossacarídeos e a distribuição de grupamentos sulfato (OSO_3^-) ou átomos de enxofre (PÉREZ-RECALDE et al., 2014). Adicionalmente, a presença de ésteres de sulfato confere elevada eletronegatividade, que permite a interação eletrostática desses compostos com proteínas específicas, um ponto chave para as suas atividades biológicas (POMIN, 2009).

3.7.1. AÇÕES FARMACOLÓGICAS DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS E TOXICIDADE

Os polissacarídeos sulfatados obtidos a partir de algas apresentam inúmeras atividades biológicas, entre essas, a atividade antiviral está entre as mais estudadas e tem demonstrado efeito contra importantes patógenos humanos, tais como o vírus herpes simples, citomegalovírus humano, HIV, vírus da dengue e vírus sincicial respiratório, uma vez que, a atividade antiviral desses compostos está relacionada à formação de complexos que bloqueiam a interação dos vírus com as células, mesmo que as aplicações sistêmicas tenham inconvenientes, a sua estrutura e modo de ação indicam potencial para utilização em formulações tópicas, com o intuito de prevenir infecções por vírus (THUY et al., 2015; RABANAL et al., 2014; DAMONTE; MATULEWICZ; CEREZO, 2004).

Ademais, o potencial terapêutico desses compostos tem sido explorado com o propósito de desenvolver medidas terapêuticas contra o câncer, e tem apresentado citotoxicidade frente a células cancerosas, inibição da invasão, metástase e angiogênese (SENTHILKUMAR et al., 2013).

De acordo com Senthilkumar et al. (2013), os polissacarídeos sulfatados extraídos de algas marrons, conhecidos como fucanas, inibem a proliferação e induzem a apoptose em linhagem de células de linfoma humano. Do mesmo modo, polissacarídeos obtidos a partir de algas vermelhas *Bostrychia montagnei* e *Porphyra columbia* têm demonstrado atividade antiproliferativa frente a linhagem celular tumoral de cólon uterina (STEVAN et al., 2001).

No estudo realizado por Azevedo et al. (2009) foi demonstrado que polissacarídeos obtidos a partir da alga marrom *Fucus vesiculosus*, além de atuarem de forma eficiente como anticoagulante, apresentam baixa atividade hemorrágica quando comparado a heparina. Dentre os estudos mais recentes, foi investigado o efeito de polissacarídeos sulfatados obtidos a partir da alga *Grateloupia lívida* sobre o Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA), e Tempo de Protrombina (TP) usando plasma humano normal, os resultados obtidos demonstraram que esses compostos tem ação anticoagulante e podem servir como fontes naturais alternativas. Além disso, foi observado que esses polissacarídeos possuem ação antioxidante (TANG et al., 2017).

Vários trabalhos reportam a atividade antioxidante de polissacarídeos sulfatados extraídos de algas (BARAHONA et al., 2011; SOUZA et al., 2011). Na caracterização da ação de polissacarídeos obtidos da alga *Hypnea musciformis* sobre a colite induzida em ratos, foi observado após tratamento, manutenção ou reparo dos níveis de glutathione, um marcador de estresse oxidativo *in vivo*, sugerindo uma ação antioxidante endógena dessas macromoléculas frente a danos provocados pelo estresse oxidativo. Ademais, esses polissacarídeos reduziram de forma significativa marcadores de migração de leucócitos, como a mieloperoxidase, citocinas pró-inflamatórias (IL-13 e TNF- α), isso permite sugerir também atividade anti-inflamatória (BRITO et al., 2014).

Na avaliação da ação desses biopolímeros frente a processos inflamatórios, Silva et al. (2011) avaliaram o efeito gastroprotetor de polissacarídeos isolados da alga *Gracilaria caudata*, em camundongos, os resultados mostraram que o tratamento reduziu o dano gastrointestinal e sugerem efeito protetor através de mecanismos que envolvem a inibição da infiltração de células inflamatórias e peroxidação lipídica.

A avaliação dos efeitos de polissacarídeos obtidos a partir de *Gracilaria cornea* em modelos de experimentação animal mostrou que esses compostos são capazes de reduzir o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético, além disso, no teste de formalina, teste da placa quente, no modelo de peritonite e edema de pata induzida por

carragenana, os resultados obtidos, em conjunto, demonstraram que esses biopolímeros apresentam atividades antinociceptiva e anti-inflamatória (COURA et al., 2012). Recentemente, polissacarídeos extraídos das algas *H. musciformis* e *Gracilaria caudata* tiveram atividade antidiarreica comprovada em modelos de diarreia induzida pelo óleo de rícino e pela toxina da cólera (SOUSA et al., 2016; COSTA et al., 2016).

Ademais, estudos têm demonstrado que polissacarídeos sulfatados extraídos de algas inibem a ligação da toxina termoestável (TS), produzida pela ETEC, aos receptores presentes na parede dos enterócitos, essa toxina é responsável pela indução de diarreia secretora em animais (GONÇALVES et al., 2008). Essa inibição da ligação ocorre devido a similaridade estrutural entre os polissacarídeos, que são constituídos de unidades de galactose sulfatada, e o receptor dessa toxina, que contém grupos sulfatados do tipo 3'-sulfogalactosil-ceramida (ROUSSET; HAREL; DUBREUIL, 1998).

Em geral, os dados publicados até o momento referentes à avaliação da segurança dos polissacarídeos extraídos de algas demonstram que essas macromoléculas possuem carácter atóxico (Tabela 1).

Tabela 1. Toxicidade de polissacarídeos obtidos a partir de algas.

Espécie	Toxicidade	Referência
<i>Caulerpa racemosa</i>	(-)	RIBEIRO et al., 2014
<i>Caulerpa cupressoides</i>	(-)	RODRIGUES et al., 2013
<i>Gracilaria birdiae</i>	(-)	VANDERLEI et al., 2011
<i>Gracilaria cornea</i>	(-)	COURA et al., 2012
<i>Undaria pinnatifida</i>	(-)	CHUNG et al., 2010
<i>Fucus vesiculosus</i>	(-)	ZARAGOZA et al., 2008
<i>Cladosiphon okamuranus</i>	(-)	GIDEON; RENGASAMY, 2008
<i>Laminaria japonica</i>	(-)	LI; ZHANG; SONG, 2005

(-) = Ausência de efeito após a exposição. (+) = Presença de efeitos após a exposição.

Segundo Chaves (2008), a toxicidade depende de vários fatores, entre as causas intrínsecas ao organismo vítima da intoxicação pode-se destacar a forma como o agente tóxico foi administrado, a biodisponibilidade do agente no organismo, a metabolização, biotransformação e os mecanismos de eliminação do agente tóxico.

Estudos em modelos animais mostram que os polissacarídeos extraídos de algas vermelhas não são degradados de forma significativa pelo baixo pH gástrico ou bactérias do trato gastrointestinal (WEINER, 2014). Por outro lado, tem sido relatada a presença de enzimas que degradam os hidratos de carbono das algas vermelhas pela microbiota do

intestino (HEHEMANN et al., 2010). O alto peso molecular, a estrutura e estabilidade quando ligados a proteínas, contribuem para que esses polímeros não sejam absorvidos de forma significativa ou metabolizados (WEINER, 2014).

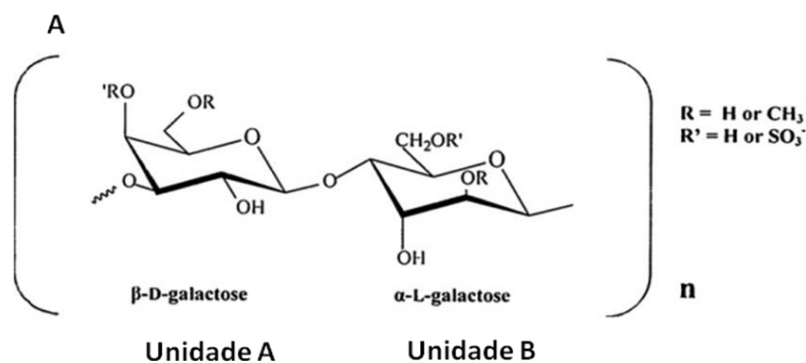
No entanto, do mesmo modo que as propriedades biológicas, a biotransformação dos polissacarídeos depende, entre outros fatores, do peso molecular e da distribuição de grupamentos sulfatados ao longo da cadeia polissacarídica (RAÚL et al., 2015; CHAVES, 2008).

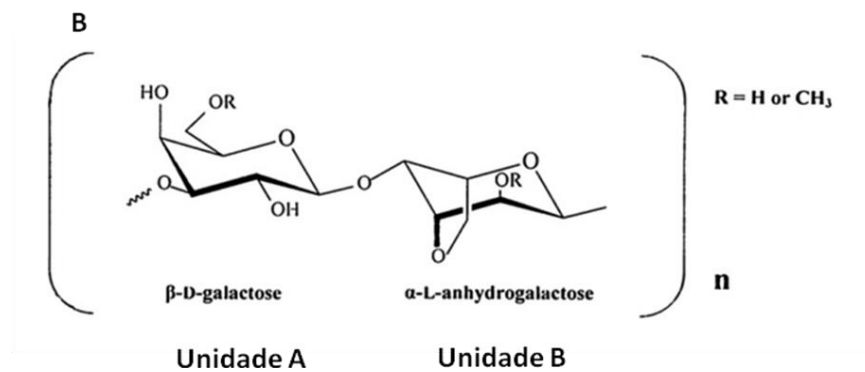
3.7.2. POLISSACARÍDEOS SULFATADOS EXTRAÍDOS DA ALGA VERMELHA (*Gracilaria intermedia*)

As algas marinhas vermelhas apresentam grande diversidade de espécies (BICUDO; MENEZES, 2010). A coloração avermelhada observada em algumas algas é devido à presença de ficoeritrina, pigmento fotossintético acessório presente no interior dos cloroplastos, sendo também encontrados, em menor quantidade: ficocianina e aloficocianina (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007).

Nas algas vermelhas, a matriz extracelular é marcada pela presença de grande variedade de galactanas sulfatadas, polímeros de galactose, formados por cadeias lineares de dissacarídeos repetitivos. Cada dissacarídeo é constituído por subunidades, A e B, arranjadas em sequências alternadas na forma $(AB)_n$. A unidade A é formada por β -D-galactose ligada através dos carbonos C1 e C3, enquanto a unidade B é composta por α -D/L-galactose ligada por meio dos carbonos C1 e C4 (Figura 6 A). Além disso, algumas unidades B podem estar na forma de α -L-anidrogalactose (Figura 6 B) (BARROS et al., 2013; CAMPO et al., 2009; PAINTER, 1983).

Figura 6. Representação da estrutura química das unidades de dissacarídeos que formam as galactanas sulfatadas extraídas de algas vermelhas.





Fonte: Adaptado de BARROS et al, 2013.

Apesar da estrutura básica repetitiva, os PLS apresentam diversidade estrutural, devido aos diferentes tipos de substituintes na cadeia principal, que originam moléculas complexas (PAINTER, 1983). Os polissacarídeos sulfatados podem ser divididos em grupos conforme a configuração enantiomérica das unidades B (α -galactose), quando essas unidades estão na configuração enantiomérica D são classificados como carragenanas, e quando presentes na configuração L são classificados como agaranas ou ágar. Ademais, alguns polissacarídeos também podem apresentar simultaneamente carragenanas e agaranas, formando um terceiro grupo de polissacarídeos onde as unidades B ou α -galactose podem estar tanto na configuração D quanto L (as galactanas DL-híbridas) (KNUTSEN et al., 1994).


Segundo Fidelis (2014), as agaranas podem ser fracionadas em unidades de agarose e unidades de agarpectina. A agarose, também chamada de agarobiose, fração gelificante, é um polissacarídeo linear neutro, que consiste de cadeias repetidas de unidades alternadas de (1→3)- β -D-galactopiranosose e (1→4) 3,6-anidro- α -L-galactose (FIDELIS, 2014). Enquanto a agarpectina, fração não gelificante, é um polissacarídeo ácido que apresenta (1→3)- β -D-galactose (unidade A) e (1→4)- α -L-galactose (unidade B) com a presença de substituintes carregados, com o sulfato (LABROPOULOS et al., 2002). A proporção dessas frações, agarose e agarpectina, varia de acordo com a espécie da alga marinha e as condições ambientais (LABROPOULOS et al., 2002).

Espécies do gênero *Gracilaria* são as principais produtoras de ágar encontradas na natureza, e apresentam agaranas formadas por unidades (1→3)- β -D-galactose (unidade A) e (1→4)-3,6,anidro- α -L-galactose (unidade B) com substituições por grupamentos metil ou sulfato (Figura 6B) (BARROS, 2011; MARINHO-SORIANO, 2006). Além disso, o ágar obtido de espécies do gênero *Gracilaria* tem sido explorado comercialmente e usado como

meio de cultura microbiológico, na formulação de cápsulas de medicamentos, base para cosméticos e em produtos alimentícios (RINAUDO, 2008; RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001).

No Brasil, várias espécies do gênero, incluindo *G. intermedia* (Rhodophyceae) (Figura 7), são encontradas em abundância na região nordeste (MARINHO-SORIANO; BOURRET, 2005). Atualmente, existem poucos estudos envolvendo essa espécie, tais como análises filogenéticas e distribuição ecológica (GURGEL; FREDEIRCQ; NORRIS, 2008; WYNNE; BRADSHAW; CARRINGTON., 2014). Contudo, têm sido relatadas propriedades anti-inflamatória, antinociceptiva (COSTA et al., 2014) e antioxidante (CASTRO et al., 2014).

Figura 7. Aspecto macroscópico da alga marinha vermelha *Gracilaria intermedia* e sua classificação taxonômica.

	Filo	Rhodophyta
	Subfilo	Eurhodophytina
	Classe	Florideophyceae
	Subclasse	Rhodymeniophycidae
	Ordem	Gracilariales
	Família	Gracilariaceae
	Gênero	Gracilaria
	Nome Botânico	<i>Gracilaria intermedia</i>
		J.Agardh 1901

Fonte: SAHAI, 2003.

O polissacarídeo isolado a partir da *G. intermedia* é uma agarana, com peso molecular de 410 kDa, composta por unidades de β -D-galactopiranosose ligada a L-galactose-6-sulfato e 3,6-anidro- α -L-galactose (COSTA et al., 2014; CASTRO et al., 2014).

Em geral, para a extração desses biopolímeros é necessário um meio aquoso, porém, ainda não há um consenso quanto ao pH ideal para a extração, pois os diferentes meios influenciam na quantidade e no tipo de polissacarídeos sulfatados extraídos, bem como na extração de contaminantes, como proteínas (ALE et al., 2011).

A extração de polissacarídeos sulfatados de algas em soluções aquosas com pH próximo ao neutro apresentam bom rendimento (SOUZA et al., 2012). Por outro lado, a extração utilizando solução em pH básico, como NaOH ou KOH, tem sido utilizada nos

processos de extração de polissacarídeos de algas devido a menor contaminação (FIDELIS et al., 2014; BONO et al., 2012; RUPÉREZ; AHRAZEM; LEAL, 2002).

Visando melhorar a extração de polissacarídeos, muitos autores introduziram o uso de enzimas proteolíticas a solução básica, pois os polissacarídeos presentes na matriz extracelular das algas muitas vezes estão presos a proteínas, que dificultam a sua remoção, desse modo, o uso de agentes proteolíticos degrada as proteínas, permitindo uma extração mais eficaz (CHANANA et al., 2013). Entre os agentes proteolíticos, a enzima papaína têm sido bastante utilizada na extração de polissacarídeos sulfatados de algas (MELO et al, 2002), nesses casos o pH da hidrólise é igual a 5,0, que é o pH ideal da papaína (FIDELIS, 2014).

Outro fator importante a ser considerado é a temperatura de extração, pois esse fator também influencia na obtenção dos polissacarídeos sulfatados (SOUZA et al., 2012). Entretanto, nas extrações cuja proteólise é inserida, há limites restritos de alterações de temperatura, pois essa irá depender da temperatura ideal da atividade enzimática. Desse modo, quando a proteólise está inserida no protocolo de extração, a maioria, utiliza a temperatura na faixa de 60 °C (COSTA et al., 2012; CAMARA; COSTA; FIDELIS, 2011.; ROCHA et al., 2005). Nesse contexto, a metodologia empregada para a extração desses biopolímeros pode afetar o rendimento, a estrutura do polissacarídeo, as propriedades físico-químicas e biológicas (PEREIRA et al., 2005; MARINHO-SORIANO et al., 2006). Portanto, o uso de uma condição em especial pode favorecer a obtenção de polissacarídeos com uma atividade que se deseja em detrimento de outras (FIDELIS, 2014).

Segundo Castro (2014), a extração de PLS da alga marinha *G. intermedia* através do método enzimático resultou em amostra com baixo efeito gelificante, fato que pode estar relacionado à quantidade de sulfato na amostra (COSSON et al., 1995). Contudo, a porcentagem de sulfato obtida na fração polissacarídica pelo método enzimático foi superior à apresentada nas frações extraídas por meio de outros métodos, tais como, extrações nas quais a alga é pré-tratada com NaOH (1%) e KOH (5%) e extração sem pré-tratamento, ou seja, quando a obtenção dos polissacarídeos ocorre com a fervura. Ademais, as amostras que tiveram pré-tratamento alcalino apresentaram quantidade menor de sulfato (CASTRO., 2014). Além disso, estudos tem demonstrado que consideráveis variações estruturais nessas macromoléculas podem sofrer influência de fatores fisiológicos, variações sazonais e do local de origem dos espécimes (PEREIRA et al., 2005; MARINHO-SORIANO et al., 2006).

Desse modo, considerando a diversidade estrutural, o fato desse recurso natural ainda ser pouco explorado e o grande potencial farmacológico dos polissacarídeos sulfatados extraídos de algas marinhas sobre distúrbios do trato gastrointestinal, como a diarreia, é de fundamental importância potencializar os meios científicos, tecnológicos e financeiros que viabilizem os estudos desses biopolímeros, visto que, os resultados obtidos poderão auxiliar a adoção de novas estratégias terapêuticas e medidas profiláticas que poderão ser usadas na atenção básica à saúde do Estado do Piauí.

REFERÊNCIAS

- ABDULLAHI, A. et al. Antidiarrhoeal activity of the aqueous extract of *Terminalia avicennoides* roots. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 431-434, 2001.
- ABRAHAM, B.; SELLIN J. Drug-induced diarrhea. **Currents Gastroenterology Reports**, v. 9, n. 5, p. 365-372, 2007.
- ABREU, C.; PRESGRAVE, O.; DELGADO, I. Metodologias Alternativas à Experimentação Animal: Aplicação no Controle da Qualidade de Produtos sujeitos à Ação da Vigilância Sanitária. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária. Brasília**. v. 45, 2008.
- AKEL, T.; BEKHEIT, S. Loperamide cardiotoxicity: "A Brief Review". **Annals of Noninvasive Electrocardiology**. v. 10, p. 1-4, 2017.
- ALE, M.; MIKKELSEN, J.; MEYER, A. Important determinants for fucoidan bioactivity: A critical review of structure-function relations and extraction methods for fucose-containing sulfated polysaccharides from brown seaweeds. **Marine drugs**, v. 9, p. 2106-2130, 2011.
- ALLEN, S. et al. A high-dose preparation of lactobacilli and bifidobacteria in the prevention of antibiotic-associated and *Clostridium difficile* diarrhoea in older people admitted to hospital: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, parallel arm trial (PLACIDE). **Health Technology Assessment**, v. 17, n. 57, p. 1-140, 2013.
- ALMEIDA, C. et al. Analysis of antidiarrhoeic effect of plants used in popular medicine. **Revista de Saúde Pública**, v. 29, p. 428-33, 1995.
- ANDRADE, J.; MOREIRA, C.; NETO, U. Diarreia persistente. **Jornal de Pediatria – Rio de Janeiro**, v.76, p.119-26. 2000.
- ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia para condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos**. Ministério da Saúde. 2013.
- ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia de orientação para registro de Medicamento Fitoterápico e registro e notificação de Produto Tradicional Fitoterápico**. Ministério da Saúde. 2014.
- ARAÚJO, J.; MARTEL, F. Regulação da absorção de glicose. Revisão. **Arquivos de Medicina**, v. 23, n. 2, p. 35-43, 2009.
- ARAÚJO, T. 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.
- ASRIE, A. et al. Antidiarrheal activity of methanolic extract of the root bark of *Cordia africana*. **Journal of Experimental Pharmacology**, v. 8, p. 53-59, 2016.

- ATANASOV, A. et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 8, p. 1582-614, 2015.
- AWOUTERS, F. et al. Delay of castor oil diarrhoea in rats: A new way to evaluate inhibitors of prostaglandin synthesis. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 30, p. 41-45, 1978.
- AZEVEDO, T. et al. Heparinoids algal and their anticoagulant, hemorrhagic activities and platelet aggregation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 63, p. 477-83, 2009.
- BALDAUF, K. et al. Cholera Toxin B: One Subunit with Many Pharmaceutical Applications. **Toxins (Basel)**, v. 7, n. 3, p. 974-996, 2015.
- BALLESTER, I. et al. Flavonoides y enfermedad inflamatoria intestinal. **ARS Pharmaceutica**, v. 47, n. 1, p. 5-21, 2006.
- BARAHONA, T. et al. Antioxidant capacity of sulfated polysaccharides from seaweeds. A kinetic approach. **Food Hydrocolloid**, v. 25, n. 3, p. 529-535, 2011.
- BARBUTI, R. Diarreias agudas. Aspectos clínicos, etiológicos e terapêuticos. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 34, 2008.
- BARDHAN, P. Improving the ORS: Does Glutamine have a Role? **Journal of Health, Population and Nutrition**, v. 25, n. 3, p. 263-266, 2007.
- BARRETT, K.; KEELY, S. Chloride secretion by the intestinal epithelium: molecular basis and regulatory aspects. **Annual Review of Physiology**, v. 62, p. 535-572, 2000.
- BARROS, F et al. Structural characterization of polysaccharide obtained from red seaweed *Gracilaria caudate* (J Agardh). **Carbohydrate polymers**, v. 92, n. 1, p. 598-603, 2013.
- BARROS, F. **Caracterização estrutural e propriedades antitumorais dos polissacarídeos extraídos da alga marinha vermelha *Gracilaria caudata* J AGARDH**. 2011. Dissertação de Mestrado em Bioquímica. Departamento de Bioquímica da Universidade federal do Ceará.
- BAYNES, J.; DOMINICZAK, M. **Bioquímica Médica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.
- BEARCROFT, C.; PERRETT, D.; FARTHING, M. 5-hydroxytryptamine release into human jejunum by cholera toxin. **Gut**, v. 39, n. 4, p. 528-31, 1996.
- BECKER, P.; WIDJAJA-GREEFKES, H.; VAN WIKSELAAR, P. Inhibition of binding of the AB5-type enterotoxins LT-I and cholera toxin to ganglioside GM1 by galactose-rich dietary components. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.7, n. 3, p. 225-33, 2010.
- BERKOWITZ, B.; KATZUNG, B. **Avaliação básica e clínica de novas drogas**. In: Katzung BG. Farmacologia básica e clínica. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

BERRIDGE, M. Smooth muscle cell calcium activation mechanisms. **The Journal of Physiology**. v. 1, n. 586, p. 5047-5061, 2008.

BERTONI, S.; GABELLA, G. Hypertrophy of mucosa and serosa in the obstructed intestine of rats. **Journal of Anatomy**. v.199, p.725-734, 2001.

BHATNAGAR, S.; LODHA, R.; CHOUDHURY, P. et al. IAP Guidelines 2006 on management of acute diarrhea. **Indian Pediatrics**. v. 44, p. 380-9, 2007.

BICUDO, C.; MENEZES, M. **Introdução: As algas do Brasil**. In: FORZZA, RC., org., et al. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Catálogo de plantas e fungos do Brasil [online]. Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro. v. 1, p. 49-60, 2010.

BINDER, H. Causes of Chronic Diarrhea. **The New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 3, p. 236-239, 2009.

BLANSHARD, C.; GAZZARD, B. Natural history and prognosis of diarrhea of unknown cause in patients with Acquired Immunodeficiency Syndrome. **Gut**, v. 36, n. 2, p. 283-6, 1995.

BLUSH, R.; MATZO, M. Acute Infectious Diarrhea: An overview of causes preventives, and treatments. **Evidence for Excellence**, v. 112, n. 8, p. 65-68, 2012.

BONO, A.; ANISUZZAMAN, S.; DING, O. Effect of process conditions on the gel viscosity and gel strength of semi-refined carrageenan (SRC) produced from seaweed (*Kappaphycus alvarezii*). **Journal of King Saud University - Engineering Sciences**, v. 26, p. 3-9, 2012.

BONTEN, M. et al. Polysaccharide conjugate vaccine against *Pneumococcal pneumonia* in adults. **The New England Journal of Medicine**, v. 372, p. 1114-25, 2015.

BOREELLI, F. et al. Potent relaxant effect of a *Celastrus paniculatus* extract in the rat and human ileum. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 122, p. 434-438, 2009.

BOUHLAL, R. et al. Antiviral activities of sulfated polysaccharides isolated from *Sphaerococcus coronopifolius* (Rhodophyta, Gigartinales) and *Boergeseniella thyoides* (Rhodophyta, Ceramiales). **Marine Drugs**, v. 9, n. 7, p. 1187-1209, 2011.

BRANDT, K.; DE CASTRO, A.; DA SILVA, G. Diarreia aguda: manejo baseado em evidencias. **Jornal de Pediatria - Rio de Janeiro**, v. 91, n. 6, p. 36-43, 2015.

BRASIL. DATASUS. IDB 2011. **Taxa de mortalidade na infância**. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/idb2011/c16.htm>>. Acessado em: Março de 2017.

BRAUNWALD, F. et al. **Harrison - Medicina Interna**. 15. ed. Rio de Janeiro: Mc Graw-Hill Companies, 2002.

BRITO, A. **Manual de Ensaio Toxicológicos In Vivo**. Campinas: UNICAMP, 1994.

BRITO, T et al. Sulfated-polysaccharide fraction extracted from red algae *Gracilaria birdiae* ameliorates trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis in rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 66, n. 8, p. 1161-70, 2014.

BROWNING, K.; TRAVAGLI, R. Central Nervous System Control of Gastrointestinal Motility and Secretion and Modulation of Gastrointestinal Functions. **Comprehensive Physiology**. v. 4, n. 4, p. 1339-1368, 2014.

BUKHAVE, K.; RASK-MADSEN, J. Saturation kinetics applied to *in vitro* effects of low prostaglandin E₂ and F₂ alpha concentrations in ion transport across human. **Gastroenterology**. v. 78, n. 1, p. 32-42, 1980.

BURAKOFF, R.; PERCY, W. Studies *in vivo* and *in vitro* on effects of PGE₂ on colonic motility in rabbits. **American Journal of Physiology**, v. 262, n. 1, p. 23-9, 1992.

BYERS, K.; GUERRANT, R.; FARR, B. **Fecal-oral transmission**. In: Thomas JC, Webber DJ, editors. *Epidemiologic Methods for the Study of Infectious Diseases*. Oxford: Oxford University Press. p. 228-48, 2001.

CAMARA, R.; COSTA, L.; FIDELIS, G. Heterofucans from the Brown Seaweed *Canistrocarpus cervicornis* with Anticoagulant and Antioxidant Activities. **Marine Drugs**, v. 9, p.124-138, 2011.

CAMILLERI, M. et al. A randomized, controlled exploratory study of clonidine in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**. v. 1, n. 2, p. 111-121, 2003.

CAMPO, V et al. Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis. **A review Carbohydrate Polymers**, v. 77, p. 167-80, 2009.

CAPASSO, E. et al. Laxatives and the production of autacoids by rat colon. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 38, n. 8, p. 627-9, 1986.

CASTRO, J. **Frações polissacarídicas obtidas a partir da alga vermelha *Gracilaria intermedia*: um estudo químico estrutural, avaliação de atividade antioxidante e caracterização reológica**. 2014. Dissertação de Mestrado em Bioquímica. Instituto de bioquímica da Universidade federal do Ceará.

CAULFIELD, M. Muscarinic receptors—characterization, coupling and function. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 58, n. 3, p. 319-79, 1993.

CHANANA, M et al. Physicochemical properties of protein-coated gol nanoparticles in biological fluids and cells before and after proteolytic digestion. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 52, n. 15, p. 419-4183, 2013.

CHASSANY, O.; MICHAUX, A.; BERGMANN, J. Drug-induced diarrhea. **Drug Safety**, v. 22, n. 1, p. 53-72, 2000.

- CHAUDHRI, O.; SMALL, C.; BLOOM, S. Gastrointestinal hormones regulating appetite. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**. v. 29, n. 361, p. 1187-1209, 2006.
- CHAVES, L. et al. Antiinflammatory and antinociceptive effects in mice of a sulfated polysaccharide fraction extracted from the marine red algae *Gracilaria caudata*. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 35, p. 93-100, 2013.
- CHAVES, L. **Polissacarídeos da alga marinha *Gracilaria birdiae* (Plastino e Oliveira): Estrutura e Avaliação Toxicológica**. 2008. Dissertação de Mestrado em Bioquímica. Departamento de Bioquímica da Universidade federal do Ceará.
- CHEN, Y. et al. Ghrelin improves LPS-induced gastrointestinal motility disturbances roles of NO and prostaglandin E2. **Shock**, v. 33, n. 2, p. 205-12, 2010.
- CHENG, S. Calcium sensing receptor: A new target for therapy of diarrhea. **World Journal of Gastroenterology**, v. 7, n. 9, p. 2711-2724, 2016.
- CHESKIN, L.; MILLER, D. **Nutrition in the prevention and treatment of common gastrointestinal symptoms**. In: Coulston A.M. & Boushey C.J. (Eds). Nutrition in the Prevention and Treatment of Disease. San Diego: Academic Press. p. 549-562. 2001.
- CHUNFANG, L. et al. Rhubarb Tannins Extract Inhibits the Expression of Aquaporins 2 and 3 in Magnesium Sulphate-Induced Diarrhea Model. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-14, 2014.
- CHUNG, H et al. Toxicological evaluation of fucoidan from *Undaria pinnatifida* in vitro and in vivo. **Phytotherapy Research**, v.24, p.1078-1083, 2010.
- CIANCIA, M.; QUINTANA, I.; CEREZO, A. Overview of anticoagulant activity of sulfated polysaccharides from seaweeds in relation to their structures, focusing on those of green seaweeds. **Current Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 23, p. 2503-2529, 2010.
- CORBETT, C.; PALMER, K.; HOLDSWORTH, C. Effect of loperamide, codeine phosphate and diphenoxylate on urgency and incontinence in chronic diarrhoea (abstract). **Gut**. v. 21, 1980.
- COSSON, J et al. Carragenans and agars, red algal polysaccharides. **Phycological Research**, v. 11, p. 269-324, 1995.
- COSTA, D. et al. Sulfated Polysaccharide Isolated from the Seaweed *Gracilaria caudata* exerts an antidiarrhoeal effect in rodents. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 118, p. 440-448, 2016.
- COSTA, L. et al. Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 64, n. 1, p. 21-28, 2010.

COSTA, L. **Fração polissacarídica extraída da alga vermelha *Gracilaria intermedia*: atividade anti-inflamatória e antinociceptiva.** 2014. Dissertação de Mestrado em Bioquímica. Instituto de bioquímica da Universidade federal do Ceará.

COSTA, M et al. Evaluating the possible anticoagulant and antioxidant effects of sulfated polysaccharides from tropical seaweed *Caulerpa cupressoides* var. flabellate. **Journal of Applied Phycology**, v. 24, n. 5, p. 1159-1167, 2012.

COSTANZO, Linda S. **Fisiologia.** 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

COURA, C et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of sulphated polysaccharides from the red seaweed *Gracilaria cornea*. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 110, p. 335-41, 2012.

CREMONINI, F. et al. Meta-analysis: the effect of probiotic administration on antibiotic-associated diarrhea. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 16, p. 1461-1467, 2002.

CRUZ, G. **Dicionário das plantas úteis do Brasil.** 5. ed. Rio de Janeiro: Civilização Brasileira, 1982.

DAMONTE, E.; MATULEWICZ, M.; CERESO, A. Sulfated seaweed polysaccharides as antiviral agents. **Current Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 18, p. 2399-419, 2004.

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

DE LUCIA, R. et al. **Farmacologia Integrada.** 3. ed. Rio de Janeiro: Livraria e Editora Revinter, 2007.

DE SALES, I et al. *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae), a medicinal plant, presents antimotility and antidiarrheal activity *in vivo*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, p. 253, 2015.

DELATTRE, C.; FENORADOSOA, T.; MICHAUD, P. Galactans: an overview of their most important sourcing and applications as natural polysaccharides. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, n. 6, p. 1075-1092, 2011.

DELGADO, N. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of methanolic extract from red seaweed *Dichotomaria obtusata*. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, n. 1, p. 65-74, 2013.

DESESSO, J.; JACOBSON, C. Anatomical and physiological parameters affecting gastrointestinal absorption in humans and rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 39, n. 3, p. 209-28, 2001.

DICARLO, G. et al. Effects of quercetin on the gastrointestinal tract in rats and mice. **Phytotherapy Research**, v. 8, p. 42-45, 1994.

DING, M.; et al. Distribution of prostaglandin E receptors in the rat gastrointestinal tract. **Prostaglandins**, v. 53, n. 3, p. 199-216, 1997.

DOUGHTY, D. **Urinary and fecal incontinence: nursing management**. 3. ed. Saint Louis: Mosby, 2006.

DUBREUIL, J. Antibacterial and antidiarrheal activities of plant products against enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Toxins**, v. 5, p. 2009-2041, 2013.

DUGGAN, C et al. Scientific rationale for a change in the composition of oral rehydration solution. **Journal of the American Medical Association**. v. 291, p. 2628-2631, 2004.

EFFERTH, T.; KAINA, B. Toxicities by herbal medicines with emphasis to traditional Chinese medicine. **Current Drug Metabolism**. v.10, p.989-96, 2011.

EGGLESTON, W.; NACCA, N.; MARRAFFA, J. Loperamide toxicokinetics: serum concentrations in the overdose setting. **Clínical Toxicology (Phila)**, v. 53, n. 5, p. 495-496, 2015.

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

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

FARTHING, M. Novel targets for the control of secretory diarrhoea. **Gut**, v. 50, p. 15-8, 2002.

FIDELIS, G. **Otimização da extração de polissacarídeos sulfatados da alga vermelha *Gracilaria birdiae* e análise da atividade anticoagulante e antioxidante**. 2014. Dissertação de Mestrado em Bioquímica. Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

FIDELIS, G.; CAMARA, R.; QUEIROZ, M. et al. Proteolysis, NaOH and ultrasound-enhanced extraction of anticoagulant and antioxidant sulfated polysaccharides from the edible seaweed, *Gracilaria birdiae*. **Molecules**, v. 19, p. 18511-26, 2014.

FIELD, M. Intestinal ion transport and the pathophysiology of diarrhea. **The Journal of Clinical Investigation**. v.111, n. 7, p. 931–943, 2003.

FIELD, M.; SEMRAD, C. Toxigenic diarrheas, congenital transport. **Annual Review of Physiology**, v. 55, p. 631-655, 1993.

FOLWACZNY, C. Zinc and diarrhea in infants. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 11, n. 2, p. 116- 122, 1997.

FUJII, S et al. PGE2 is a direct and robust mediator of anion/fluid secretion by human intestinal epithelial cells. **Scientific Reports**, v. 9, n. 6, p. 3679-5, 2016.

GALVEZ, J. et al. Antidiarrhoeal activity of *Euphorbia hirta* extract and isolation of an active flavonoid constituent. **Planta Médica**, v. 59, n. 4, p. 333-336, 1993.

GALVEZ, J. et al. Intestinal anti-inflammatory activity of UR-12746, a novel 5-ASA conjugate, on acute and chronic experimental colitis in the rat. **British Journal of Pharmacology**, v. 130, n. 8, p. 1949-59, 2000.

GAUNDALINI, S.; VAZIRI, H. **Diarrhea: Diagnostic and Therapeutic Advances: Humana Press**. 2011.

GIDEON T, RENGASAMY R. Toxicological evaluation of fucoidan from *Cladosiphon okamuranus*. **Journal of Medicinal Food**, v.11, n.4, p.638-42, 2008.

GONÇALVES, F. et al. *Escherichia coli* STb toxin binding to sulfatide and its inhibition by carrageenan. **FEMS Microbiology Letters**, v. 281, n. 1, p. 30-35, 2008.

GOODMAN, L.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

GUANDALINI, S. Probiotics for prevention and treatment of diarrhea. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 45, p. 149-153, 2012.

GUERRANT, R. et al. Practice guidelines for the management of infectious diarrhea. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, n. 3, p. 331-51, 2001.

GURGEL, C.; FREDEIRCO, S.; NORRIS, J. Two new flat species of Gracilaria (Gracilariales, Rhodophyta) from Brazil: *G. abyssalis* sp. nov. and *G. brasiliensis* sp. **Phycologia**, v. 47, n. 3, p. 249-264, 2008.

GURGEL, L. et al. Studies on the antidiarrhoeal effect of dragon's blood from *Croton urucana*. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 4, p. 319-22, 2001.

GUTIÉRREZ, S. et al. Evaluation of the anti-diarrheal activity of *Salvia connivens*. **Pharmaceutical Biology**, v. 52, p. 1467-1470, 2014.

GUYTON, A.; HALL, J. **Tratado de fisiologia médica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

HAGA, T. Molecular properties of muscarinic acetylcholine receptors. **Proceedings of the Japan Academy, Ser. B, Physical and Biological**. v. 89, n. 6, p. 226-56, 2013.

HAIDER, B.; BHUTTA, Z. The effect of the therapeutic zinc supplementation among young children with selected infections: a review of the evidence. **Food and Nutrition Bulletin**, v. 30, p. 41-59, 2009.

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

HANDOO, S et al. A comprehensive study on regulatory requirements for development and filing of generic drugs globally. **International Journal of Pharmaceutical Investigation**. v. 2, p.99-105, 2012.

HAYES, A. **Principles and Methods of Toxicology**. 5. ed. Informa: Healthcare, 2007.

HEHEMANN, J et al. Transfer of carbohydrate-active enzymes from marine bacteria to Japanese gut microbiota. **Nature**, v. 464, p. 908-912, 2010.

HENRY, P.; GOLDIE, R. Beta 1-adrenoceptors mediate smooth muscle relaxation in mouse isolated trachea. **British Journal of Pharmacology**. v. 99, n.1, p.131-5, 1990.

HINTERLEITNER, T. et al. Acetorphan prevents cholera toxin-induced water and electrolyte secretion in the human jejunum. **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**, v. 9, p. 887-91, 1997.

HIRSCHHORN, N. The treatment of acute diarrhoea in children: an historical and physiological perspective. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 33, n. 3, p. 637-63, 1980.

ISHIDA-FUJII, K. et al. Prevention of pathogenic *Escherichia coli* infection in mice and stimulation of macrophage activation in rats by oral administration of probiotic *Lactobacillus casei* I-5. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 71, p. 866-873, 2007.

ISLAM, M. et al. Preliminary pharmacological evaluation of *Alocasia indica* Schott tuber. **Journal of Integrative Medicine**, v. 11, n. 5, p. 343-51, 2013.

JANKOWSKI, J.; GOODLAD, R.; WRIGHT, N. Maintenance of normal intestinal mucosa: function, structure, and adaptation. **Gut**. v. 35, 1994.

JOHNSON-HENRY, K. et al. Amelioration of the effects of *Citrobacter rodentium* infection in mice by pre-treatment with probiotics. **Journal of Infectious Diseases**, v. 191, p. 2106-2117, 2005.

KATZUNG, B. **Basic & Clinical Pharmacology**. 9. ed. New York: McGrawHill, 2004.

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

KHANSARI, M.; SOHRABI, M.; ZAMANI, F. The Usage of Opioids and their Adverse Effects in Gastrointestinal Practice: A Review. **Middle East Journal of Digestive Diseases**. v. 5, p. 5-16, 2013.

KIM, Y. et al. Effect of DA-6034, a derivative of flavonoid, on experimental animal models of inflammatory bowel disease. **Archives of Pharmacal Research**, v. 22, n. 4, p. 354-60, 1999.

KLOAREG, B.; QUATRANO, R. Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides. **Oceanography and Marine Biology - An Annual Review**, v. 26, p. 259-315, 1988.

KNUTSEN, S. et al. A modified system of nomenclature for red algal galactans. **Botanica marina**, v. 37, n. 2, p. 163-170, 1994.

KOLBOW, J. et al. Extended-release but not immediate-release and subcutaneous methyl naltrexone antagonizes the loperamide-induced delay of whole-gut transit time in healthy subjects. **The Journal of Clinical Pharmacology**. v. 56, n. 2, p. 239-45, 2016.

KOMAL, K.; RANA, A. Herbal approaches for diarrhoea: A review. **International Research Journal of Pharmacy**. p.4:31-8, 2013.

KUNZELMANN, K.; MALL, M. Electrolyte transport in the mammalian colon: mechanisms and implications for disease. **Physiological Reviews**, v. 82, n. 1, p. 245-289, 2002.

LABROPOULOS, K.C.; NIESZ DE.; DANFORTH, S.C.; KEVREKIDIS, P.G. Dynamic rheology of agar gels: theory and experiments. Part I. Development of a rheological model. **Carbohydrate Polymers**, v. 50, p. 393-406, 2002.

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

LEE, Y.; KEENER, J. A calcium-induced calcium release mechanism mediated by calsequestrin. **Journal of Theoretical Biology**. v. 253, n. 4, p. 668-79, 2008.

LI N, ZHANG Q, SONG J. Toxicological evaluation of fucoidan extracted from *Laminaria japonica* in wistar rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, n. 3, p. 421-6, 2005.

LI, N. et al. Structural characterization and anticoagulant activity of a sulfated polysaccharide from the green alga *Codium divaricatum*. **Carbohydrate Polymers**, v. 121, p. 175-182, 2015.

LIMA, A.; FONTELES, M. From *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin to mammalian endogenous *Guanylin hormones*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 47, n. 3, p. 179-191, 2014.

LOCHNER, M.; THOMPSON, A. The muscarinic antagonists scopolamine and atropine are competitive antagonists at 5-HT₃ receptors. **Neuropharmacology**. v. 108, p. 220-228, 2016.

- LONGSTRETH, G. et al. Functional bowel disorders. **Gastroenterology**, v. 130, n. 5, p. 1480-91, 2006.
- MAINIL, J. *Escherichia coli* virulence factors. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 152, n. 1, p. 2-12, 2013.
- MANATSATHIT, S et al. Guideline for the management of acute diarrhea in adults. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**. 2002.
- MANZIONE, C et al. Achados colonoscópicos e histológicos em doentes HIV+ com diarréia crônica. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 23, p. 256-261, 2003.
- MARINHO-SORIANO, E.; BOURRET, E. Polysaccharides from the red seaweed *Gracilaria dura* (Gracilariales, Rhodophyta). **Bioresource Technology**, v. 96, n. 3, p. 379-382, 2005.
- MARINHO-SORIANO, E et al. Seasonal variation in the chemical composition of two tropical seaweeds. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 18, p. 2402-2406, 2006.
- MASCOLO, N et al. Inhibitors of nitric oxide synthase prevent castor-oil-induced diarrhoea in the rat. **British Journal of Pharmacology**, v. 108, p. 861-864, 1993.
- MATHAN, V. Diarrhoeal diseases. **British Medical Bulletin**, v. 54, n. 2, p. 407-419, 1998.
- MATUCHANSKY, C.; MARY, J.; BERNIER, J. Further studies on prostaglandin E1-induced jejunal secretion of water and electrolytes in man, with special reference to the influence of ethacrynic acid, furosemide, and aspirin. **Gastroenterology**, v. 71, n. 2, p. 274-81, 1976.
- MCCORRY, L. Physiology of the Autonomic Nervous System. **American Journal of Pharmaceutical Education**. v. 71, n. 4, 2007.
- MEDEIROS, J. et al. Role of KATP channels and TRPV1 receptors in hydrogen sulfide-enhanced gastric emptying of liquid in awake mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 15, p. 57-63, 2012.
- MEHMOOD, M. et al. Antidiarrhoeal, antisecretory and antispasmodic activities of *Matricaria chamomilla* are mediated predominantly through K⁺-channels activation. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, p. 15-75, 2015.
- MELO, M. et al. Isolation and characterization of soluble sulfate polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria cornea*. **Carbohydrate Polymers**, v.49, n. 4, p. 491-498, 2002.
- MORAES, E.; CASTRO, F. Diarreia aguda. Rede Interagencial de Informações para a Saúde. **Jornal Brasileiro de Medicina**. v. 102, p. 21-27, 2014.

MOURAD, F. Animal and human models for studying effects of drugs on intestinal fluid transport *in vivo*. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 50, p. 3-12, 2004.

MURUGESAN, T. et al. Evaluation of antidiarrhoeal profile of *Jussiaea suffruticosa* Linn. extract in rats. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 381-383, 2000.

NANO, J.; FOURNEL, S.; RAMPAL, P. Characterization of delta-opioid receptors and effect of enkephalins on IRD 98 rat epithelial intestinal cell line. **Pflugers Archive-European Journal of Physiology**, v. 439, p. 547-554, 2000.

NELSON, D.; COX, M. **Biossinalização. Lehninger - Princípios de Bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2006.

OECD - ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. 2001. Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 420: Acute Oral Toxicity - Fixed Dose Method. Disponível em: <https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oecd/oecd_gl420.pdf>.

OECD - ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. 2001. Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 423: Acute Oral Toxicity - Acute Toxic Class Method. Disponível em: <https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oecd/oecd_gl423.pdf>. Acessado em: Setembro de 2017.

OECD - ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. 2008. Guidelines for the testing of chemicals. Guideline 425: Acute oral toxicity – Up-and-Down-Procedure (UDP). Disponível em: <https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oecd/oecd_tg425.pdf>. Acessado em: Setembro de 2017.

OJEWOLE, J.; AWE, E.; CHIWORORO, W. Antidiarrhoeal activity of *Psidium guajava* Linn. (Myrtaceae) leaf aqueous extract in rodents. **Journal of Smooth Muscle Research**. v. 44, n. 6, p. 195-207, 2008.

OVALLE, W.; NAHIRNEY, P. **Netter, Bases da Histologia**. Rio de Janeiro, Elsevier, 2008.

PAGE, J.; DIRNBERGER, G. Treatment of the Irritable Bowel Syndrome with Bentyl (Dicyclomine Hydrochloride). **Journal of Clinical Gastroenterology**. v. 3, p. 153-156, 1981.

PAINTER, T. Algal Polysaccharides. In: ASPINALL, G. O. Aspinall (Ed). **The polysaccharides**. New York: Academic Press, v. 2, p. 195-285, 1983.

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

PANIZZI, L et al. In vitro antimicrobial activity of extracts and isolated constituents of *Rubus ulmifolius*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, p.165-168, 2002.

PARKES, G.; SANDERSON, J.; WHELAN, K. The mechanisms and efficacy of probiotics in the prevention of *Clostridium difficile* associated diarrhea. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 9, n. 4, p. 237-44, 2009.

PERCIVAL, E.; MCDOWELL, R. **Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides**. London; New York: Academic Press, 1967.

PEREIRA, J. et al. Polysaccharides isolated from *Digenea simplex* inhibit inflammatory and nociceptive responses. **Carbohydrate polymers**, v. 108, p. 17-25, 2014.

PEREIRA, M et al. Structure and anticoagulant activity of a sulfated galactan from the red alga *Gelidium crinale*. Is there a specific structural requirement for the anticoagulant action? **Carbohydrate Research**, v. 340, n. 12, p. 2015-2023, 2005.

PÉREZ-RECALDE, M et al. *In vitro* and *in vivo* immunomodulatory activity of sulfated polysaccharides from red seaweed *Nemalion helminthoides*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 63, p. 38-42, 2014.

PERFEITO, P. et al. Efeitos da temperatura, intensidade luminosa e concentração de fósforo na composição química de *Gelidium crinale* (Turner) *Lamouroux* (Rhodophyta, Gelidiaceae). **Bioscience Journal**, v. 12, n.1, p. 3-10, 2004.

PETRI JUNIOR, W. et al. Enteric infections, diarrhea and their impact on function and development. **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 4, p. 1277-1290, 2008.

PINTO, A. et al. Time course of PAF formation by gastrointestinal tissue in rats after castor oil challenge. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 44, n. 3, p. 224-226, 1992.

POMIN, V. Review: An overview about the structure–function relationship of marine sulfated homopolysaccharides with regular chemical structures. **Biopolymers**, v. 91, p. 601-609, 2009.

PONCE, P. **Manual de Terapêutica Médica**. 2. ed. Lisboa: Lidel, 2010.

POWELL, C.; JENKINS, H. Toddler diarrhea: is it a useful diagnostic label? **Archives of Disease in Childhood**, v. 97, n.1, p. 84-6, 2012.

PUGLISI, M. et al. Capisterones A and B from the tropical green alga *Penicillus capitus* unsuspected anti-fungal defenses targeting the marine pathogen *Lindra thalassiae*. **Tetrahedron**, v. 60, n. 33, p. 7035-7039, 2004.

RABANAL, M et al. The system of fucoidans from the brown seaweed *Dictyota dichotoma*: chemical analysis and antiviral activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 804-11, 2014.

RABBANI, G. et al. Randomized controlled trial of berberine sulfate therapy for diarrhea due to enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 155, n. 5, p. 979-84, 1987.

RAÚL, E et al. Proteins and carbohydrates from red seaweeds: evidence for beneficial effects on gut function and microbiota. **Marine Drugs**, v.13, n.8, p. 5358-5383, 2015.

RAVEN, P.; EVERT, R.; EICHHORN, S. **Biologia vegetal**. 7. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2007.

RAVEN, P.; EVERT, R.; EICHHORN, S. **Protista II: Heterocontas e algas verdes**. In: *Biologia vegetal*. 6. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2001.

REGNARD, C.; TWYXCROSS, R.; MIHALYO, M. et al. Loperamide. **Journal of Pain and Symptom Management**. v. 42, n. 2, p. 319-23, 2011.

RIBEIRO, N et al. Sulfated polysaccharides isolated from the green seaweed *Caulerpa racemosa* plays antinociceptive and anti-inflammatory activities in a way dependent on HO-1 pathway activation. *Inflammation Research*. v. 63, n. 7, p. 569-80, 2014.

RINAUDO, M. Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. **Polymer International**, v. 57, n. 3, p. 397-430, 2008.

RIVIERE, P. et al. Prostaglandin E2-induced diarrhea in mice: importance of colonic secretion. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 256, n. 2, p. 547-552, 1991.

RMAN, R.; BURLEIGH, D. Evidence for the involvement of a 5-HT₄ receptor in the secretory response of human small intestine to 5-HT. **British Journal of Pharmacology**. v. 110, p. 927-928, 1993.

ROBERT, A. et al. Enteropooling assay: A test for diarrhea produced by prostaglandins. **Prostaglandins**, v. 11, n. 5, p. 809-28, 1976.

ROCHA, H. A. et al. Polissacarídeos sulfatados de algas marinhas com atividade anticoagulante. **Infarma**, v. 16, p. 82-87, 2004.

ROCHA, H.; MORAES, F.; TRINDADE, E et al. Structural and hemostatic activities of a sulfated galactofucan from the brown alga *Spatoglossum schroederi* - An ideal antithrombotic agent? **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p.41278-88, 2005.

RODRIGUES, J et al. In vivo toxicological evaluation of crude sulfated polysaccharide from the green seaweed *Caulerpa cupressoides* var. lycopodium in swiss mice. **Maringá**, v. 35, n. 4, p. 603-610, 2013.

ROSENTHAL, R. et al. Claudin-2, a component of the tight junction, forms a paracellular water channel. **Journal of Cell Science**, v. 123, p. 1913-1921, 2010.

ROUSSET, E.; HAREL, J.; DUBREUIL, J. Sulfatide from the pig jejunum brush border epithelial cell surface is involved in binding of *Escherichia coli* enterotoxin b. **Infection and Immunity**, v. 66, p. 5650-5658, 1998.

RUMESSEN, J.; VANDERWINDEN, J. Interstitial cells in the musculature of the gastrointestinal tract: Cajal and beyond. **International Review of Cytology**. v. 229, p.115-208, 2003.

RUPÉREZ, P.; AHRAZEM, O.; LEAL, J. Potential antioxidant capacity of sulfated polysaccharides from the edible marine brown seaweed *Fucus vesiculosus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 4, p.840-845, 2002.

SAHAI, T. *Gracilaria intermedia* J. Agardh. Catalog #: 655123. UNIVERSITY OF MICHIGAN HERBARIUM. 2003. Disponível em: <http://macroalgae.org/portal/collections/individual/index.php?occid=294806>. Acessado em: 25/06/2017.

SANDERS, K. A case for interstitial cells of Cajal as pacemakers and mediators of neurotransmission in the gastrointestinal tract. **Gastroenterology**. v. 111, n. 2, p. 492-515, 1996.

SANIOTO, D.; AIRES, M. **Sistema digestivo: secreção**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

SCHILLER, L.; SELLIN, J. Diarrhea. In: Feldman M., Friedman L.S., Brandt L.J., editors. **Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease: Pathophysiology, Diagnosis, Management**. 9. ed. Saunders; Philadelphia. p. 211-231, 2010.

SENTHILKUMAR, K et al. Brown seaweed fucoidan: biological activity and apoptosis, growth signaling mechanism in cancer. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 60, p. 366-74, 2013.

SESAPI - SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DO PIAUÍ. **Diarréia mata uma criança a cada 15 segundos em todo o mundo**. 2014. 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>>. Acessado em: Março de 2017.

SHAH, S. et al. A Study of Parasitic and Bacterial Pathogens Associated with Diarrhea in HIV-Positive Patients. **Cureus**, v.8, n. 9, p. 807, 2016.

SHAO, P.; CHEN, X.; SUN, P. *In vitro* antioxidant and antitumor activities of different sulfated polysaccharides isolated from three algae. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 62, p. 155-6, 2013.

SHERMAN, P.; JOHNSON-HENRY, K .; YEUNG, H et al. Probiotics reduce enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7- and enteropathogenic *E. coli* O127:H6-induced

changes in polarized T84 epithelial cell monolayers by reducing bacterial adhesion and cytoskeletal rearrangements. **Infection and Immunity**, v.73, p.5183-5188, 2005.

SILVA, R. et al. Sulfated-polysaccharide fraction from red algae *Gracilaria caudata* protects mice gut against ethanol-induced damage. **Marine Drugs**, v. 9, p. 2188-2200, 2011.

SILVERTHORN, D. **Fisiologia humana: uma abordagem integrada**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed. 2010.

SIMON, B.; KATHER, H. Interaction of laxatives with enzymes of cyclic AMP metabolism from human colonic mucosa. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 10, p. 231-234, 1980.

SIMPSON, H.; CAMPBELL, B. Review article: dietary fibre-microbiota interactions. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 41, p. 1-22, 2015.

SITHRANGA, B.; KATHIRESAN, K. Anticancer drugs from marine flora: An Overview. **Journal of Oncology**, v. 2010, p. 1-18, 2010.

SIXMA, T. et al. Lactose binding to heat-labile enterotoxin revealed by X-ray crystallography. **Nature**, v. 355, p. 561-564, 1992.

SLONCZEWSKI, J.; FOSTER, J. **Microbiology: An Evolving Science**. 3 ed. **Norton & Company**. New York, 2009.

SOMLYO, A.; SOMLYO, A. Signal transduction and regulation in smooth muscle. **Nature**, v. 372, p. 231-236, 1994.

SOUSA, N. et al. The efficacy of a sulfated polysaccharide fraction from *Hypnea musciformis* against diarrhea in rodents. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 86, p. 865-75, 2016.

SOUZA, B et al. Antioxidant potencial of two red seaweed from the Brazilian coasts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 10, p. 5589-5594, 2011.

SOUZA, B et al. Chemical characterization and antioxidant activity of sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria birdiae*. **Food Hydrocolloids**, v. 27, p. 287-292, 2012.

STEVAN, F et al. Cytotoxic effects against HeLa cells of polysaccharides from seaweeds. **Journal of submicroscopic cytology and pathology**, v. 33, n. 4, p. 477-484, 2001.

STEVENS, A.; LOWE, J. **Histologia humana**. 2. ed. São Paulo: Manole, 2001.

STRASINGER, S.; DI LORENZO, M. **Urinalysis and body fluids**. 5. ed. Philadelphia, USA: F. A. Davis Company, 2009.

SUGURO, M et al. Muscarinic Receptor Subtypes Mediating Ca²⁺ Sensitization of Intestinal Smooth Muscle Contraction: Studies with Receptor Knockout Mice. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 72, n. 4, p. 443-451, 2010.

SZAJEWSKA, H. et al. Systematic review: racecadotril in the treatment of acute diarrhoea in children. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 26, n. 6, p. 807-13, 2007.

SZAJEWSKA, H.; KOLODZIEJ, M. Systematic review with meta-analysis: *Saccharomyces boulardii* in the prevention of antibiotic-associated diarrhea. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 42, p. 793- 801, 2015.

TADESSE, W. et al. Experimental assessment of antidiarrheal and antisecretory activity of 80% methanolic leaf extract of *Zehneria scabra* in mice. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 1, p. 460, 2014.

TANG, L et al. Purification, partial characterization and bioactivity of sulfated polysaccharides from *Grateloupia livida*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 94, p. 642-652, 2017.

TERRIN, G.; CANANI, R. Recent progress in congenital diarrheal disorders. **Current Gastroenterology Reports**, v. 13, p. 257- 264, 2011.

THAPAR, N.; SANDERSON, I. Review on diarrhea in children: an interface between developing and developed countries. **Lancet**, v. 363, p. 641-653, 2004.

THIAGARAJAH, J et al. Prevention of toxin-induced intestinal ion and fluid secretion by a small-molecule CFTR inhibitor. **Gastroenterology**, v. 126, p. 511-519, 2004.

THIAGARAJAH, J.; VERKMAN, A. CFTR Inhibitors for Treating Diarrheal Disease. **Clínical Pharmacology & Therapeutics**, v. 92, n. 3, p. 287- 290, 2012.

THUY, T et al. Anti-HIV activity of fucoidans from three brown seaweed species. **Carbohydrate Polymers**, v.115, p.122-8, 2015.

TIAN, F et al. Antioxidant and antimicrobial activities of consecutive extracts from *Galla chinensis*: The polarity affects the bioactivities. **Food Chemistry**, v.113, p.173-179, 2009.

TRIPATHI, K. Essentials of Medical Pharmacology. **Jaypee Brothers Medical Publishers**. v. 10, p. 775, 1994.

TURVILL, J.; FARTHING, M. Enkephalins and enkephalinase inhibitors in intestinal fluid and electrolyte transport. **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**, v. 9, p. 877-80, 1997.

UGHTON, L.; FOSTER, J.; WHORWELL, P. Alosetron, a 5-HT₃ receptor antagonist, delays colonic transit in patients with irritable bowel syndrome and healthy volunteers. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**. v. 14, p. 775-782, 2000.

UNICEF - UNITED NATIONS CHILDREN'S FUND. **Committing to Child Survival: A promise renewed – Progress report**. 2015. Disponível em: <http://www.apromiserenewed.org/wp-content/uploads/2015/09/APR_2015_8_Sep_15.pdf>. Acessado em: Março de 2017.

UNICEF - UNITED NATIONS CHILDREN'S FUND. **One is too many: Ending child deaths from pneumonia and diarrhea**. 2016. Disponível em: <https://www.unicef.org/lac/20161111_UNICEF-one-is-too-many-report.pdf>. Acessado em: Março de 2017.

UNICEF - UNITED NATIONS CHILDREN'S FUND; WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Diarrhoea: why children are still dying and what can be done**. Geneve, 2009.

VAN GELDRE, L.; LEFEBVRE, R. Interaction of NO and VIP in gastrointestinal smooth muscle relaxation. **Current Pharmaceutical Design**. v.10, n. 20, p. 2483-97, 2004.

VALADARES, M. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “Era do Teste DL50”. **Revista Eletrônica de Farmácia**.v. 3, n. 2, p. 93-98, 2006.

VANDERLEI, E et al. The involvement of the HO-1 pathway in the anti-inflammatory action of a sulfated polysaccharide isolated from the red seaweed *Gracilaria birdiae*. **Inflammation Research**, v. 60, p. 1121-1130, 2011.

VIGUERA, R.; ROJAS-CASTANEDA, J.; HERNANDEZ, R. et al. Histological characteristics of the intestinal mucosa of the rat during the first year of life. **Laboratory Animal Science Journal**. v.33, p.393-400, 1999.

WALKER, H.; HALL, W.; HURST, J. **Clínical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations**. 3. ed. Boston: Butterworths, 1990.

WANG, H.; SHIEH, M.; LIAO, K. A blind, randomized comparison of racecadotril and loperamide for stopping acute diarrhea in adults. **World Journal of Gastroenterology**, v.11, n. 10, p.1540-3, 2005.

WEINER, M. Food additive carrageenan: Part II: a critical review of carrageenan in vivo safety studies. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 44, n. 3, p. 244-69, 2014.

WGO - WORLD GASTROENTEROLOGY ORGANISATION. Probióticos e prebióticos: diretrizes mundiais (tradução) 2011. Disponível em: <www.worldgastroenterology.org>. Acessado em: Março de 2017.

- WHYTE, L.; JENKINS, H. Pathophysiology of diarrhoea. **Pediatrics Child Health**, v. 22, n. 10, p. 443-7, 2012.
- WONGSAMITKUL, N. et al. A plant-Derived Hydrolysable Tannin Inhibits CFTR Chloride Channel: A Potential Treatment of Diarrhea. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 3, p. 490-7, 2010.
- WYNNE, M.; BRADSHAW, T.; CARRINGTON, C. A checklist of the benthic marine algae of Barbados, West Indies. **Botânica Marina**, v. 57, n. 3, p. 167-184, 2014.
- XIE, X.; WANG, J.; ZHANG, H. Characterization and antitumor activities of a water-soluble polysaccharide from *Ampelopsis megalophylla*. **Carbohydrate Polymers**, v. 129, p. 55-61, 2015.
- YAKOUB, M. et al. Preventive zinc supplementation in developing countries: impact on mortality and morbidity due to diarrhea, pneumonia and malaria. **BMC Public Health**, v. 11, n. 3, p. 23, 2011.
- ZARAGOZÁ M et al. Toxicity and antioxidant activity in vitro and in vivo of two *Fucus vesiculosus* extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 17, p. 7773-80, 2008.
- ZHANG, H.; PAN, F.; ZHAO, X. et al. Distribution and antimicrobial resistance of enteric pathogens in Chinese paediatric diarrhoea: a multicentre retrospective study, 2008-2013. **Epidemiology & Infection**. v. 143, n. 12, p. 2512-2519, 2015.

4. CAPÍTULO I

Parte desse capítulo encontra-se publicado na International Journal of Biological Macromolecules - Qualis A2, Fi = 3.6. Anti-Diarrhoeal Therapeutic Potential and Safety Assessment of Sulphated Polysaccharide Fraction from Gracilaria intermedia Seaweed in Mice.

Potencial Terapêutico Antidiarreico e Avaliação da Segurança de uma Fração de Polissacarídeos Sulfatados Extraídos da Alga Marinha *Gracilaria intermedia* em Camundongos

Ana Carolina M. Leódido^a; Luis E. C. Costa^b; Thiago S. L. Araújo^a; Douglas S. Costa^a;
Nayara A. Sousa^a; Luan K. M. Souza^a; Francisca B. M. Sousa^c; Manoel D.S. Filho^a; Daniel
F.P. Vasconcelos^d; Felipe R. P. Silva^d; Kerolayne M. Nogueira^c; Alyne R. Araújo^a; Francisco
Clark N. Barros^{b,e}; Ana Lúcia P. Freitas^b and Jand Venes R. Medeiros^{a,c,d*}

^a Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil.

^b Laboratório de Proteínas e Carboidratos de Algas Marinhas, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil.

^c Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia, Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Reis Velloso, Parnaíba, Piauí, Brasil.

^d Programa de Pós-graduação em Ciências Biomédica, Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, Piauí, Brasil.

^e Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, Juazeiro do Norte, Ceará, Brasil.

Título curto: Efeito antidiarreico e avaliação da segurança da PLS-Gi

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar a composição química, o efeito antidiarreico e a toxicidade aguda de uma fração de polissacarídeos sulfatados obtida da *Gracilaria intermedia* (PLS-Gi). Inicialmente, foi realizada a caracterização estrutural da fração polissacarídica obtida após a extração por meio da Espectrometria na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier. A atividade antidiarreica da PLS-Gi foi avaliada no modelo de diarreia induzida pelo óleo de rícino. Posteriormente, o efeito da PLS-Gi sobre a diarreia induzida pela toxina da cólera (TC) foi examinado, além disso, foi avaliada a sua possível interação com os monossialogangliosídeos GM1. Os efeitos da PLS-Gi também foram investigados sobre diarreia induzida por *E. coli*. Em seguida, foi investigado o potencial de toxicidade aguda, seguindo as diretrizes da OECD *Guideline* 423/2001. O espectro de infravermelho da PLS-Gi apresentou bandas atribuídas à agarana e grupamentos sulfatos no C-6 dos resíduos de L-galactose. O pré-tratamento com a PLS-Gi reduziu as fezes totais, diarreicas e o *enteropooling*. A PLS-Gi (30 mg/kg, *v.o.*) aumentou a atividade de Na⁺/K⁺ - ATPase e reduziu o trânsito gastrointestinal por meio de mecanismos anticolinérgicos sem interferir no esvaziamento gástrico. No modelo de diarreia induzida pela TC, a PLS-Gi inibiu a secreção do líquido intestinal e diminuiu a perda de íons Cl⁻. O teste de ELISA demonstrou que a PLS-

Gi pode interagir com o GM1 e a TC. A PLS-Gi reduziu a diarreia induzida por *E. coli* e impediu a perda de peso dos animais. Além disso, no ensaio de toxicidade aguda da PLS-Gi, os animais não exibiram qualquer sinal de efeito adverso. Em conjunto, esses resultados sugerem que a PLS-Gi é uma possível candidata para o tratamento de diarreias agudas.

Palavras-chave: Algas marinhas, macromoléculas sulfatadas, diarreia aguda.

1. Introdução

A diarreia é uma desordem gastrointestinal caracterizada pelo aumento da frequência de evacuações (três ou mais vezes por dia), acompanhada de diminuição da consistência das fezes, e que pode levar a um desequilíbrio eletrolítico [1]. Apesar das melhorias nas condições de saúde pública e da redução da mortalidade relacionada à diarreia, nos últimos anos, essa manifestação clínica continua matando crianças com menos de cinco anos de idade [2].

Nos países em desenvolvimento, bactérias produtoras de toxinas (*Vibrio cholerae* e *Escherichia coli*), bactérias enteroinvasivas (*Shigella* e *Salmonella*), protozoários (*Entamoeba histolytica* e *Cryptosporidium parvum*) e vírus (Rotavírus) são os principais causadores de diarreia [3]. Ademais, outros fatores são responsáveis pelo aparecimento desse distúrbio, como ansiedade, intolerância alimentar, medicamentos, entre outros [4].

As soluções de reidratação oral (SRO) são indicadas para o tratamento inicial das diarreias em todo o mundo. Entretanto, as SRO disponíveis atualmente são incapazes de reduzir a duração e severidade da diarreia [5]. Desse modo, a crescente demanda por moléculas com potencial terapêutico tem levado ao aumento de pesquisas envolvendo organismos de origem marinha, devido a sua grande biodiversidade [6]. Entre essas moléculas, os polissacarídeos sulfatados obtidos a partir de algas marinhas tem grande potencial terapêutico para o tratamento de várias doenças. Desse modo, inúmeras atividades biológicas têm sido descritas, tais como: atividade antioxidante [7], anti-inflamatória,

antinociceptiva [8], anticoagulante [9], anticâncer [10], antiviral [11], antimicrobiana [12], gastroprotetora [13] e antidiarreica [14, 15].

Os polissacarídeos sulfatados obtidos a partir da alga vermelha do gênero *Gracilaria*, pertencente à Família Gracilariaceae e Filo Rhodophyta, são compostos, principalmente, de galactanas sulfatadas constituídas por resíduos alternantes de 3- β -D-galactose (unidade A) e 4- α -L-galactose (ou 3,6-anidrogactose) (unidade B) [16, 17]. Essas macromoléculas, geralmente, possuem alto peso molecular e elevada eletronegatividade devido aos grupos éster sulfato em sua estrutura, que permite interações eletrostáticas com proteínas específicas contribuindo para diferentes atividades biológicas [18].

Espécies do gênero *Gracilaria* são encontradas em abundância em regiões tropicais [19]. No Brasil, várias espécies desse gênero, incluindo a *Gracilaria intermedia*, são encontradas na costa do nordeste. Atualmente, existem poucos estudos envolvendo essa espécie, tais como análises filogenéticas e distribuição ecológica [20, 21]. Devido ao baixo número de artigos científicos envolvendo a *G. intermedia* e polissacarídeos sulfatados, e considerando o potencial terapêutico desses biopolímeros em doenças do trato gastrointestinal, é essencial a condução de pesquisa nessa área. Desse modo, os resultados obtidos poderão permitir a adoção de novas terapias e medidas profiláticas. Assim, a proposta deste estudo foi investigar o efeito antidiarreico de uma fração de polissacarídeos sulfatados extraídos da *G. intermedia* (PLS-Gi) em camundongos, e conduzir uma avaliação da toxicidade aguda.

2. Material e Método

2.1. Extração da fração de polissacarídeos sulfatados

Os espécimes da alga foram coletados em Abril de 2013, na costa do nordeste do Brasil (Praia de Taíba, de São Gonçalo, Ceará), os exemplares coletados foram catalogados no herbário ficológico do Instituto de Ciências do Mar da Universidade Federal do Ceará (nº 2386).

Em seguida, as algas foram lavadas com água destilada e secas a 25 °C. A extração dos polissacarídeos foi realizada de acordo com o método descrito por Farias et al. [22]. A alga seca (5 g) foi suspensa em 250 mL de tampão acetato de sódio 0,1M (pH 5,0), contendo 30 mg/mL de papaina, 5 mM de EDTA, 5 mM de cisteína, e incubada a 60 °C durante 40 min. Após a filtração em membrana de nylon, os polissacarídeos foram precipitados com a adição de 16 mL de solução de cloreto de cetilpiridínio (CPC) a 10%. Após 24 h à temperatura ambiente, a mistura foi filtrada novamente em membrana nylon. Em seguida, os polissacarídeos sulfatados foram lavados com 500 mL de solução de 0,05% de CPC dissolvido em 100 mL de uma solução 2 mol/L de NaCl-etanol (100:15, v/v). Posteriormente, os polissacarídeos em solução foram precipitados com 200 mL de etanol absoluto. Após a incubação por 24 h, a 4°C, o precipitado foi filtrado e lavado com etanol a 80%, e em seguida, com etanol absoluto e acetona. Posteriormente, a secagem foi realizada por fluxo de ar quente (60 °C). O rendimento dos polissacarídeos foi calculado da seguinte forma:

Rendimento dos polissacarídeos (%) = massa do material seco obtido (g) / massa da alga seca usada no processo de extração (g) × 100.

2.2. Caracterização de composição química

A dosagem de proteínas na fração de polissacarídeos obtida foi realizada de acordo com o método proposto por Bradford [23], e a albumina sérica bovina foi usada para a

confeção da curva padrão. O espectro da fração de polissacarídeos foi obtido através da dispersão em pastilhas de KBr e, foi utilizado um Espectrofotômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) da Shimadzu, modelo 8300, apresentando uma janela espectral de 400 a 4000 cm^{-1} .

2.3. Animais

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos Swiss (*Mus musculus*), pesando entre 25-30 g, de ambos os sexos, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Piauí (UFPI). Os animais foram mantidos em gaiolas e acondicionados no laboratório com temperatura controlada, acesso à água e ração *ad libitum*.

2.4. Aspectos Éticos

Os procedimentos e protocolos experimentais usados nesse estudo foram aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará (Protocolo nº 11/2013). Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas do Guia para Cuidado e Uso de Animais de Laboratório [24].

2.5. Reagentes e Drogas

Todos os reagentes e drogas utilizados nos experimentos foram de grau analítico: Papaína (Merck - Kenilwoth, NJ, USA), Cloridrato de Xilazina e Cloridrato de Cetamina (Syntec - Cotia, SP, Brasil), óleo de rícino, betanecol, atropina, toxina da cólera, monossialogangliosídeo-GM1, reagente de Splittgerber, e 3,3',5,5'-tetramethylbenzidina (Sigma - St. Louis, MO, USA), Cloridrato de Loperamida (Janssen-Cilag Farmacêutica LTDA - São Paulo, SP, Brasil), Cloridrato de Naloxona (Cristália Produtos Químicos

Farmacêuticos LTDA - Nova Itapira, SP, Brasil), Sulfato de Atropina (Isofarma Industrial Farmacêutica LTDA - Fortaleza, CE, Brasil). Todas as drogas foram dissolvidas em solução tampão fosfato-salina (PBS) ou solução salina.

2.6. Avaliação da atividade antidiarreica da PLS-Gi

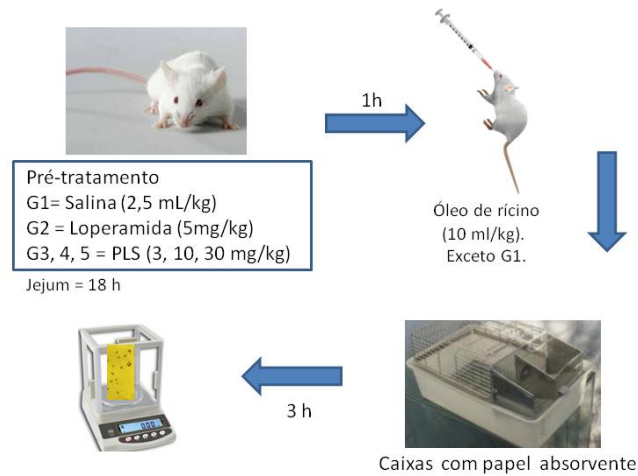
2.6.1. Diarreia induzida pelo óleo de rícino

O óleo de rícino foi usado para induzir a diarreia de acordo com o método descrito por Awouters et al. [25] com algumas modificações. Os camundongos foram distribuídos aleatoriamente em 6 grupos de 5-6 animais por grupo, e privados de comida durante 18 horas antes do experimento, mas tiveram livre acesso à água. Inicialmente, o grupo 1 recebeu solução salina enquanto os grupos 2, 3, 4 receberam PLS-Gi (3, 10, e 30 mg/kg *v.o.*, respectivamente), o grupo 5 recebeu loperamida (5 mg/kg *v.o.*), e o grupo 6 recebeu apenas o veículo (solução salina). Após 1 hora, o óleo de rícino (10 ml/kg *v.o.*) foi administrado para os grupos 1 a 5, para a indução da diarreia, enquanto o grupo 6 recebeu apenas solução salina. Após a indução da diarreia, os animais foram colocados em caixas forradas com papel absorvente por 3 horas para detectar as características das fezes, incluindo avaliação da quantidade total de fezes (mg) e quantidade total de fezes diarreicas (mg) excretadas. A porcentagem de inibição da diarreia foi calculada da seguinte forma:

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

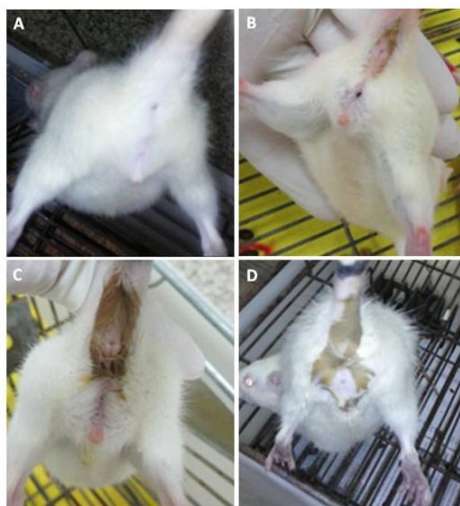
Onde A corresponde à massa média de defecação causada pelo óleo de rícino, B indica a massa média de defecação após o tratamento com salina, PLS-Gi ou loperamida.

Figura 1. Modelo de diarreia induzida pelo óleo de rícino para a avaliação do efeito antidiarreico da PLS-Gi.



A severidade da diarreia induzida por óleo de rícino foi observada e registrada como uma pontuação baseada na consistência das fezes (escores), de acordo com o método descrito por Dicarlo et al. [26], onde as fezes normais (ou ausência de diarreia) = 0, fezes semi-sólidas = 1, fezes pastosas em pequena/moderada quantidade = 2 e fezes aquosas/fezes em grande quantidade = 3.

Figura 2. Escores atribuídos à diarreia induzida pelo óleo de rícino.



SEVERIDADE DA DIARREIA
<p>Escores de 0-3:</p> <p>0= ausência de diarreia;</p> <p>1= eliminação de fezes de aspecto semi-sólido;</p> <p>2= eliminação de fezes com aspecto pastoso em pequena/moderada quantidade</p> <p>3= eliminação de fezes de aspecto fluido ou pastoso em grande quantidade.</p>

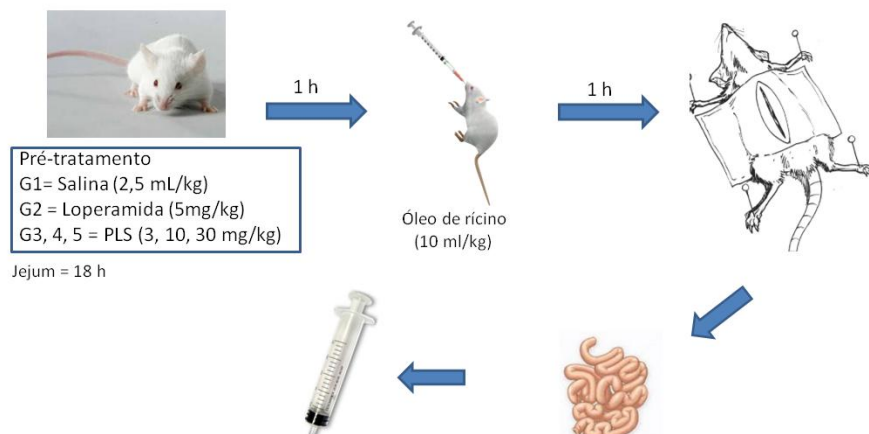
2.6.2. Acúmulo de fluido intestinal (*enteropooling*) induzido por óleo de rícino

O ensaio do *enteropooling* induzido por óleo de rícino foi realizado de acordo com o método descrito por Robert et al. [27] com algumas modificações. Os camundongos foram privados de alimento durante 18 horas antes do experimento e distribuídos aleatoriamente em 5 grupos de 6 animais por grupo. Inicialmente, o grupo 1 recebeu solução salina enquanto os grupos 2, 3, e 4 receberam (3, 10 e 30 mg/kg *v.o.*, respectivamente), e o grupo 5 recebeu loperamida (5 mg/kg *v.o.*). Após 1 hora, todos os grupos foram tratados com óleo de rícino (10 ml/kg *v.o.*). Após 3 horas, os animais foram eutanaziados, laparomizados, e o intestino delgado (a partir do piloro ao ceco) foi isolado, pinçado e retirado da cavidade abdominal. Posteriormente, o volume do conteúdo intestinal foi quantificado com o auxílio de uma seringa graduada. A eficácia de cada tratamento foi expressa como porcentagem de inibição do volume do fluido intestinal (%) e foi calculada da seguinte forma:

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

Onde A corresponde ao volume de fluido intestinal após a administração do óleo de rícino, e B indica o volume de fluido intestinal após o tratamento com salina, PLS-Gi ou loperamida.

Figura 3. Modelo utilizado para avaliar o efeito da PLS-Gi sobre acúmulo de fluido intestinal (*enteropooling*) induzido por óleo de rícino.



2.6.3. Determinação da atividade da Na^+/K^+ - ATPase

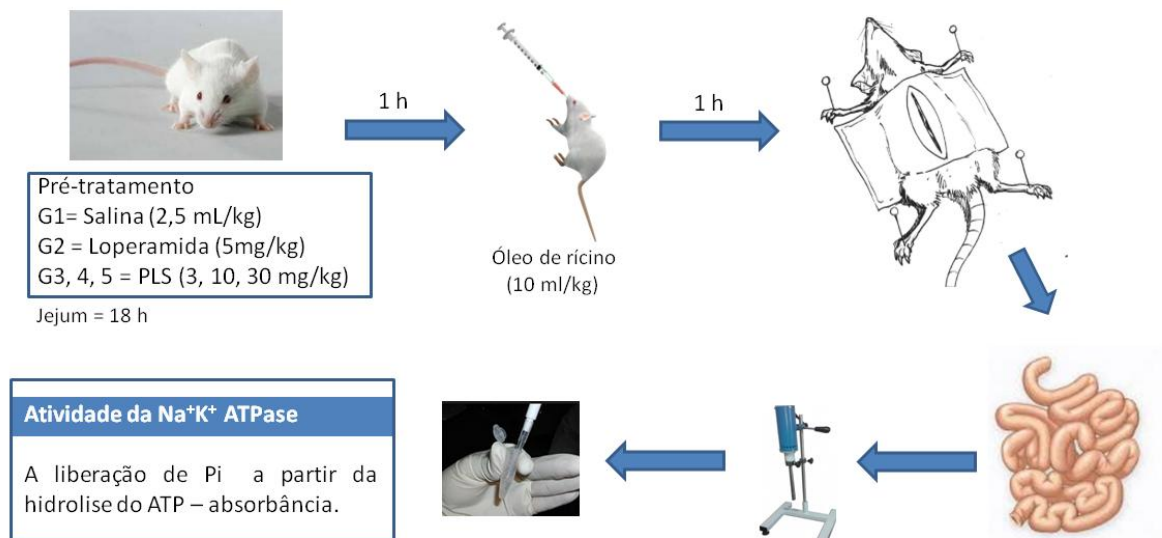
Inicialmente, o óleo de rícino foi usado para induzir a diarreia como descrito anteriormente, seguindo o método descrito por Awouters et al. [25]. Antes do experimento, os camundongos foram submetidos a jejum de 18 horas, com livre acesso à água e distribuídos aleatoriamente em 3 grupos de 6 animais por grupo. Inicialmente, o grupo 1 recebeu solução salina, enquanto o grupo 2 recebeu PLS-Gi (30 mg/kg *v.o.*) e o grupo 3 recebeu loperamida (5 mg/kg *v.o.*). Após 1 hora, todos os grupos foram tratados com o óleo de rícino (10 ml/kg *v.o.*). Posteriormente, os animais foram eutanaziados, laparomizados, e o intestino delgado (a partir do piloro ao ceco) foi isolado, pinçado e retirado da cavidade abdominal para avaliar a atividade da Na^+/K^+ - ATPase presente nos enterócitos, usando o método descrito por Bewaji et al [28]. Em seguida, amostras de três segmentos do intestino foram maceradas em 200 mM NaCl, 40 mM KCl, e 60 mM Tris (pH 7,4) para cada 40 mg de tecido. Posteriormente, alíquotas de 20 μl do homogenato intestinal foram misturadas a 20 μl de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 80 mM, 20 μl de EGTA 20 mM e 240 μl de água destilada. Essas misturas foram incubadas em banho-maria a 37 °C por 5 minutos. Em seguida, a reação foi iniciada pela adição de 100 μl de ATP 8 mM e os tubos foram incubados a 37 °C por 30 minutos. Posteriormente, foi adicionado 200 μl de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS, 5%) juntamente com 2.000 μl de reagente de Splittgerber (solução de molibdato de amônio e ácido sulfúrico) e ácido ascórbico 9% na proporção 4:1 (v/v). Em seguida, essa mistura foi incubada por 30 minutos a temperatura ambiente para o desenvolvimento de cor. A amostra do branco foi preparada da mesma maneira, exceto que o sobrenadante do intestino delgado foi substituído por 20 μl de água destilada. A absorbância foi mensurada a 560 nm em espectrofotômetro. A concentração de fosfato inorgânico (Pi) no tecido foi validada a partir de uma curva de calibração obtida com concentrações conhecidas. A atividade da Na^+/K^+ - ATPase foi padronizada em termos

de concentração de proteínas nas amostras de tecidos do intestino delgado, determinada seguindo os procedimentos de acordo com as instruções do fabricante (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, Brasil). A atividade específica de $\text{Na}^+ \text{K}^+ - \text{ATPase}$ foi calculada da seguinte forma:

Atividade da $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$ ($\mu\text{mol Pi/mg}$ de proteína/hora) = $[\text{Pi}] \times 2 \times \text{fator de diluição}/1000 \times \text{concentração de proteína (mg/mL)}$.

Onde $[\text{Pi}]$ representa a concentração de fosfato inorgânico em nmol (obtido da curva de calibração); 2 representa o fator introduzido para obter a quantidade de Pi liberado por hora; 1000 representa o fator introduzido para converter o Pi liberado para μmol .

Figura 4. Modelo utilizado para avaliar a atividade da $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$.



2.6.4. Trânsito gastrointestinal

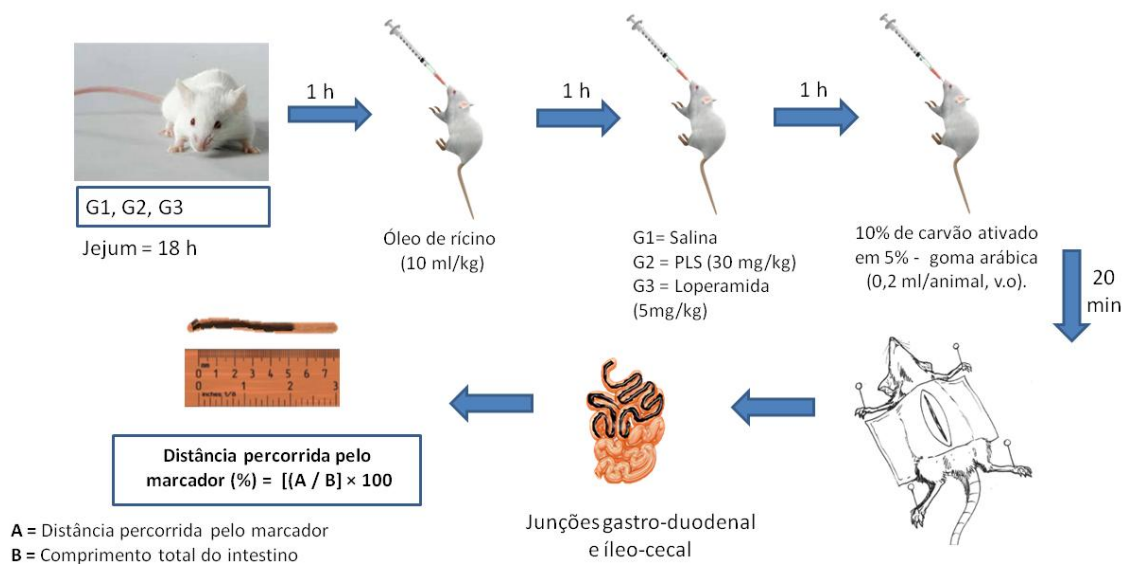
O trânsito gastrointestinal foi avaliado usando uma solução de carvão como marcador de acordo com o método descrito por Dicarlo et al. [26]. Inicialmente, o efeito da PLS-Gi na redução da motilidade gastrintestinal no modelo de diarreia induzido com o óleo de rícino foi

avaliado. Os camundongos foram distribuídos de forma aleatória em 3 grupos, com 6 animais cada. Os animais foram privados de comida durante 18 horas antes do experimento, mas tiveram livre acesso à água. Todos os grupos receberam óleo de rícino (10 mL/kg *v.o.*) para induzir a diarreia, 30 minutos depois, o grupo 1 recebeu solução salina, enquanto o grupo 2 recebeu PLS-Gi (30 mg/kg *v.o.*) e o grupo 3 recebeu (5 mg/kg *v.o.*). Após 1 hora, os animais receberam uma solução de carvão (0,2 mL contendo 10% de carvão ativado suspenso em 5% de goma arábica) por via oral. Decorridos 20 minutos, os animais foram eutanasiados, e distância percorrida pelo carvão (marcador) em relação ao comprimento total do intestino delgado foi mensurada e expressa como porcentagem da distância percorrida, onde:

$$\text{Distância percorrida pelo marcador (\%)} = [A / B] \times 100$$

Onde A corresponde à distância percorrida pelo marcador, e B representa o comprimento total do intestino.

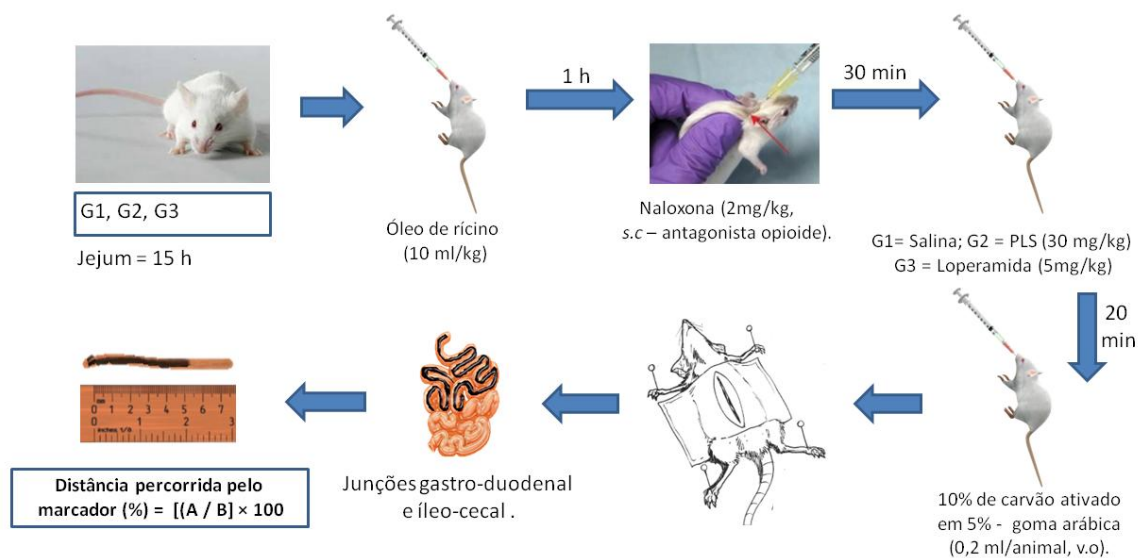
Figura 5. Modelo utilizado para determinar o efeito da PLS-Gi sobre a motilidade gastrointestinal.



Em seguida, para examinar um possível envolvimento do sistema opioide no efeito da PLS-Gi na redução do trânsito gastrointestinal induzido por óleo de rícino, os camundongos

foram distribuídos de forma aleatória em 3 grupos, com 6 animais, e receberam naloxona (2 mg/kg, *s.c.*; antagonista opioide). Após trinta minutos, os animais receberam por via oral solução salina (grupo 4), PLS-Gi (30 mg/kg) (grupo 5) ou loperamida (5 mg/kg; agonista opioide) (grupo 6), as mesmas doses foram administradas para os grupos 1, 2 e 3, respectivamente. Os passos seguintes foram realizados como descrito anteriormente.

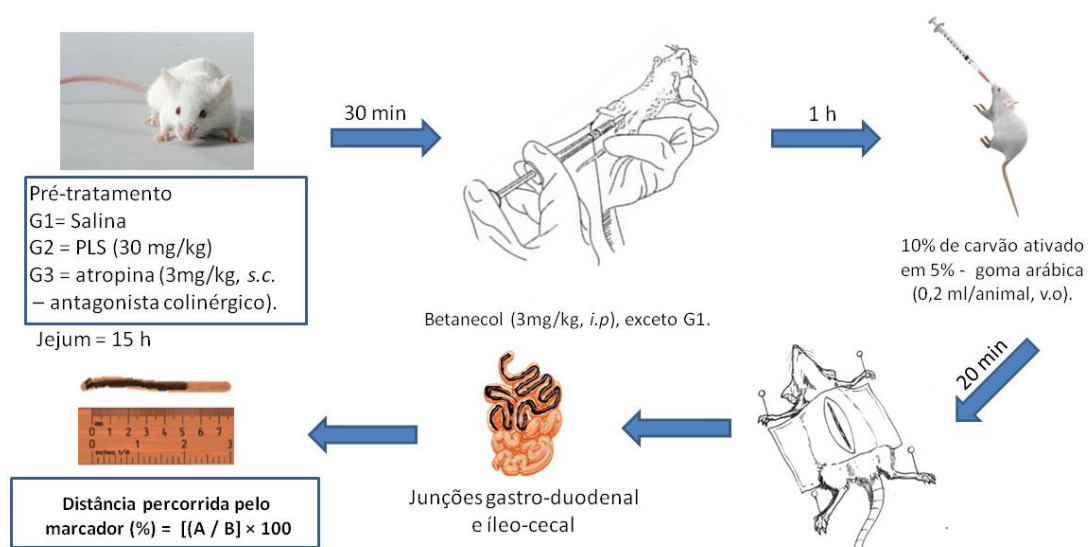
Figura 6. Modelo do trânsito gastrointestinal induzido pelo óleo de ricino utilizado para avaliar a influência da PLS-Gi sobre receptores opioides.



Em seguida, para avaliar uma possível atividade anticolinérgica da PLS-Gi na redução do trânsito gastrointestinal, foi usado o modelo do trânsito gastrointestinal estimulado pelo betanecol, um agonista colinérgico de receptores muscarínicos, de acordo com o método descrito por Moraes et al [29]. Os camundongos foram distribuídos de forma aleatória em 4 grupos, com 6 animais, e pré-tratados oralmente com solução salina (grupo 7), PLS-Gi (30 mg/kg, *v.o.*) (grupo 8) ou atropina (3 mg/kg, *s.c.*; antagonista colinérgico) (grupo 9). Após 30 minutos, os grupos 7 a 9 receberam betanecol (3 mg/kg, *i.p.*). O grupo 10 recebeu apenas solução salina (controle). Após 1 hora, todos os animais receberam por via oral uma

suspensão de carvão (0,2 mL contendo 10% de carvão ativado suspenso em 5% de goma arábica) por via oral. Decorridos 20 minutos, os camundongos foram eutanasiados e distância percorrida pelo carvão no intestino, a partir do piloro ao ceco, foi mensurada como descrito anteriormente.

Figura 7. Modelo utilizado para investigar o efeito da PLS-Gi sobre receptores colinérgicos.



2.7. Avaliação do esvaziamento gástrico

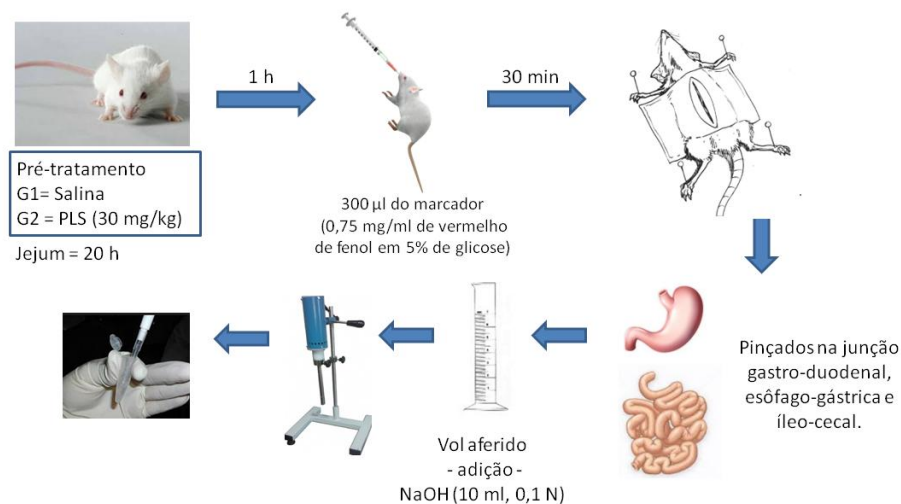
O esvaziamento gástrico foi aferido através da técnica de Reynell e Spray [30]. Após jejum de 20 horas, os camundongos do grupo controle foram tratados por via oral com solução salina (2,5 ml/kg), enquanto o grupo teste foi tratado com PLS-Gi (30 mg/kg). Após 1 hora, os camundongos receberam por gavagem, 300 µl de uma solução contendo um marcador não absorvível (0,75 mg/ml de solução de vermelho de fenol em 5% de glicose), por via oral. Decorridos 20 minutos, os animais foram eutanasiados e após a laparotomia, o estômago e o intestino delgado foram expostos, rapidamente isolados por ligaduras nas junções gastro-duodenal, esôfago-gástrica e íleo-cecal sendo finalmente removidos. Após a

remoção, estômago e intestino delgado foram colocados em uma mesa e divididos nos seguintes segmentos: estômago e intestino. Cada um desses segmentos foi introduzido em um cilindro graduado e o volume total foi aferido através da adição de 10 ml de NaOH 0,1 N. Em seguida, os segmentos foram homogeneizados por 30 s.

Após 20 minutos da homogeneização, foi retirado 1 mL do sobrenadante e centrifugado por 10 minutos à 2800 rpm. As proteínas no homogeneizado foram precipitadas através da adição de ácido tricloroacético (20 %), e novamente centrifugadas por 20 min à 2800 rpm. A seguir, foram retirados 150 µl do sobrenadante e adicionado a 200 ml de NaOH 0,5 N e 600 µl de água destilada. As absorbâncias foram medidas a 540 nm com o auxílio de um espectrofotômetro e expressas em densidade óptica (D.O.). A curva padrão foi obtida a partir de uma concentração conhecida de vermelho de fenol diluída em NaOH 0,1 N. Após a determinação do coeficiente linear (α) da curva padrão, a concentração da solução ($C = D.O.$) e a quantidade de fenol vermelho (m) por cada segmento ($m = C \times \text{volume}$) foram determinadas. A retenção gástrica foi expressa em porcentagem da seguinte forma:

$$\text{Retenção de corante no estômago (\%)} = \frac{\text{quantidade de fenol vermelho no estômago}}{\text{fenol vermelho no estômago} + \text{intestino}} \times 100.$$

Figura 8. Modelo utilizado para determinar o efeito da PLS-Gi sobre o esvaziamento gástrico.

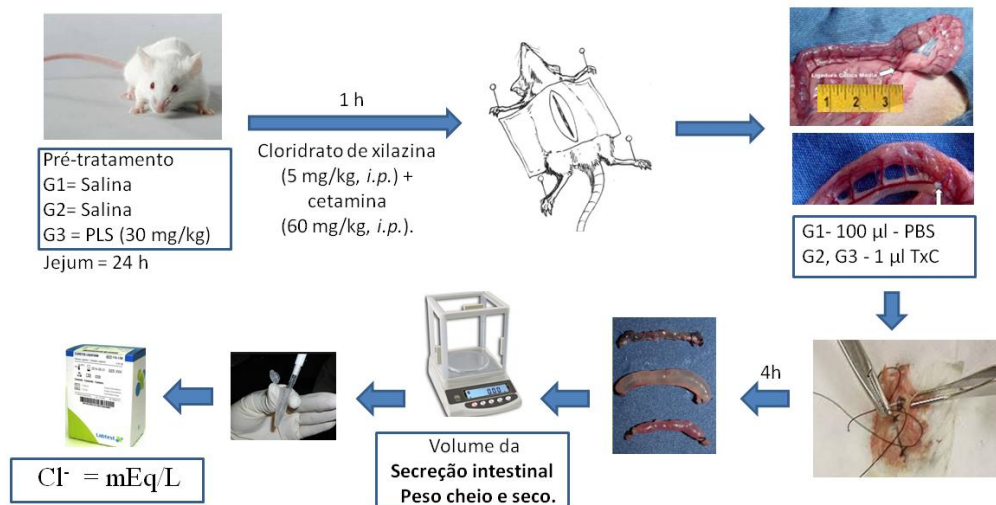


2.8. Avaliação da atividade antidiarreica da PLS-Gi na diarreia secretora induzida pela toxina da cólera

2.8.1. Efeito da PLS-Gi na secreção de fluido induzida pela toxina da cólera em alças intestinais isoladas

O efeito inibitório dos polissacarídeos sobre a secreção de fluido intestinal induzida pela inoculação da toxina da cólera (TC) foi avaliado seguindo o método descrito por Tradtrantip et al. [31]. Os animais foram colocados em jejum 24 h antes do experimento, mas com acesso a água *ad libitum* e distribuídos aleatoriamente em 3 grupos. Os camundongos do grupo 1 (controle negativo) e grupo 2 (controle positivo) foram pré-tratados oralmente com solução salina (2,5ml/kg, *v.o.*), enquanto o grupo 3 recebeu a PLS-Gi (30mg/kg, *v.o.*). Os animais então foram anestesiados com uma combinação de cloridrato de xilazina (5 mg/kg, *i.p.*) e cloridrato de cetamina (60 mg/kg, *i.p.*). Após 1 hora, foi realizada a laparotomia e uma porção do jejuno foi isolada e fechada com dupla laçada com fio de sutura, de modo a formar uma alça intestinal medindo aproximadamente 2-3 cm. As alças intestinais foram inoculados com 100 µl de solução salina tamponada com fosfato (PBS) para o grupo 1 (controle negativo), e a TC foi dissolvida em PBS (1 µg/alça) para os grupos 2 e 3. As alças intestinais foram devolvidas para a cavidade abdominal, a incisão abdominal foi fechada com suturas. Decorridas 4 horas após a anestesia, os animais foram eutanasiados e as alças isoladas foram rapidamente removidas da cavidade abdominal. A secreção de fluido intestinal foi medida indiretamente através da relação do peso/comprimento da alça, expressa em g/cm. O conteúdo intestinal acumulado em cada alça isolada foi recolhido separadamente para medir a concentração de íons cloreto (Cl⁻).

Figura 9. Modelo utilizado para avaliar o efeito da PLS-Gi sobre a diarreia induzida pela toxina da cólera.



2.8.2. Determinação da concentração de íons cloreto no fluido intestinal

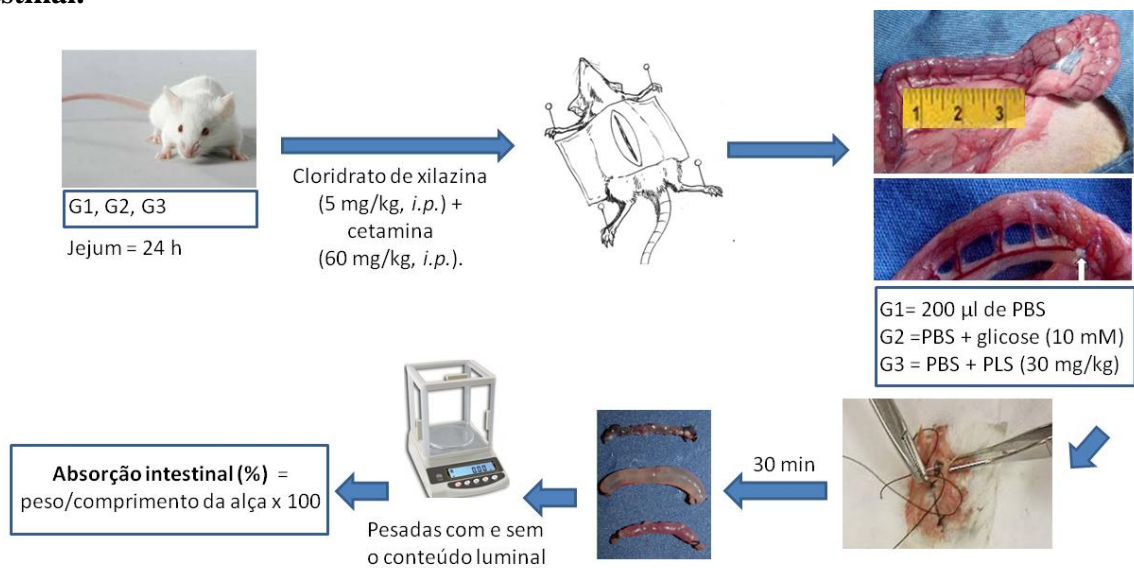
O fluido intestinal acumulado em cada alça isolada foi centrifugado a 4000 rpm durante 10 minutos e o sobrenadante foi retirado e diluído de 1:2 com água destilada. Em seguida, as concentrações dos íons cloreto foram determinadas de acordo com as instruções do fabricante (Labtest, São Paulo, Brasil). As absorbâncias foram medidas a 470 nm com o auxílio de um espectrofotômetro. Os valores obtidos foram expressos em mEq/L.

2.8.3. Efeito da PLS-Gi na absorção intestinal em alças intestinais isoladas

O efeito da PLS-Gi na absorção intestinal foi determinado de acordo com o método previamente descrito por Tradtrantip et al. [31]. Antes dos experimentos, os animais foram colocados em jejum por 24 horas com livre acesso à água. As alças intestinais isoladas foram obtidas como descrito anteriormente. Em seguida, durante a cirurgia, foram inoculadas 200 µl de PBS (controle negativo) (grupo 1), PBS contendo 10 mM de glicose (controle positivo para a absorção de fluidos) (grupo 2), ou PBS contendo a PLS-Gi (30mg/kg) (grupo 3). As alças intestinais foram devolvidas para a cavidade abdominal e a laparotomia foi fechada com

sutura. Trinta minutos após a inoculação nas alças, os animais foram eutanasiados, a cavidade abdominal foi reaberta e as alças intestinais isoladas foram removidas. As alças foram pesadas com e sem o conteúdo luminal e o volume do conteúdo intestinal foi calculado indiretamente pela subtração dos dois valores. A porcentagem de absorção de fluidos foi medida indiretamente como a relação do peso/comprimento da alça isolada.

Figura 10. Modelo utilizado para determinar o efeito da PLS-Gi sobre a absorção intestinal.



2.8.4. Ensaio GM1-ELISA

A capacidade de ligação da PLS-Gi ao GM1 foi analisada pelo teste de ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) como descrito por Saha et al. [32]. Inicialmente, as microplacas de 96 poços (Global Plast, China) foram cobertas com GM1 (2 µg/ml) diluído em PBS a 1%, e foi realizada a adição de 100 µL/poço, em seguida, as placas foram incubadas *overnight* a temperatura ambiente. Os locais de ligação extras, regiões não cobertas pelo GM1, foram bloqueadas pela adição de 200 µl/poço de PBS contendo 1% de BSA (p/v), em seguida, as placas foram incubadas durante 30 min a 37 °C. Após cada etapa, as placas foram lavadas três vezes com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (v/v). Soluções contendo a TC

(Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), sem e com diferentes concentrações da PLS-Gi (1 a 500 µg/ml) foram adicionadas às placas, e incubadas à temperatura ambiente durante 2 h. Após a etapa de lavagem, 100 µl de anticorpo diluído 1:2000 em PBS foram adicionados. Para o teste de ELISA, foram utilizados o anticorpo anti-toxina da cólera produzido em coelho (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), seguido de um anticorpo anti-imunoglobulina G de coelho produzido em cabras, conjugado com uma peroxidase (GE Healthcare, Amersham Place, UK). As placas foram então 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. A intensidade de cor foi medida a 492 nm no leitor de ELISA (Bio-Rad). Cada experimento foi realizado em triplicata e validado com a curva padrão obtida de concentrações conhecidas da TC (100 a 1,56 ng/ml), utilizada para estimar a quantidade de TC/poço. Para o controle negativo foram utilizados poços com GM1 adsorvido, contudo, não foi feita a adição da TC.

2.9. PLS-Gi e *Escherichia coli* enterotoxigênica

2.9.1. Avaliação dos efeitos da PLS-Gi na diarreia induzida pela *Escherichia coli*

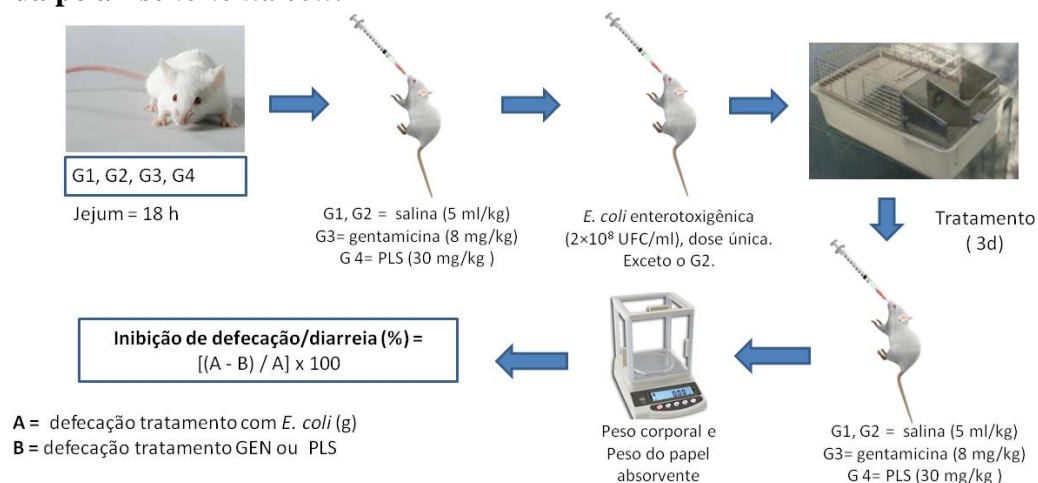
Cepas de *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) foram utilizadas para induzir a diarreia de acordo com o método descrito por Bisson et al [33] com modificações. Os camundongos foram divididos em 4 grupos, de 6 animais, e colocados em jejum por 18 horas com livre acesso a água. Inicialmente, os animais do grupo 1 (controle negativo) e grupo 2 (controle positivo) foram pré-tratados com solução salina (5 ml/kg, *v.o.*), o grupo 3 recebeu o antibiótico padrão gentamicina (8 mg/kg, *v.o.*) e o grupo 4 foi pré-tratado com PLS-Gi (30 mg/kg, *v.o.*) por 3 dias. As cepas de ETEC foram obtidas do laboratório de microbiologia do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, Brasil. A suspensão da *E. coli*

foi feita em solução salina estéril contendo 2×10^8 UFC/ml mensurada com o auxílio de um espectrofotômetro. A diarreia foi induzida em todos os grupos, exceto controle negativo, após a administração de dose oral única de solução salina contendo ETEC (5 mg/kg), incubada a 37°C . Após a administração das drogas, os animais foram colocados em gaiolas forradas com papel absorvente e foram observados diariamente, durante 3 dias, para detectar a quantidade de fezes. Ao longo desse período, foi realizado o registro do peso corporal dos animais. Além disso, a quantidade total de fezes (g) e o total de fezes diarreicas (g) excretada por cada grupo foi monitorada por três dias. A eficácia de cada tratamento foi expressa como porcentagem de inibição da diarreia (%) comparada com o resultado do grupo controle positivo, considerado como 100% de diarreia. A porcentagem de inibição da diarreia foi calculada da seguinte forma:

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

Onde A indica a média da massa de defecação induzida pela ETEC; B indica a média da massa de defecação nos grupos tratados com salina, PLS-Gi ou gentamicina.

Figura 11. Modelo utilizado para determinar o efeito da PLS-Gi sobre a diarreia induzida pela *Escherichia coli*.



2.9.2. Atividade antimicrobiana de PLS-Gi pelo método de difusão em ágar

Atividade antibacteriana da PLS-Gi foi testada contra *E. coli* (ATCC 25922). A atividade antimicrobiana foi avaliada de acordo com o método descrito por Valgas et al. [34]. A suspensão da *E. coli* foi confeccionada em solução salina estéril (1×10^8 CFU/mL) e espalhada em placa de Petri contendo ágar Mueller-Hinton. Após 24 horas, a PLS-Gi (10, 30 e 50 mg/mL) foi dissolvida em salina estéril, e em seguida, foi adicionado 100 µL/poço (6 mm - diâmetro) confeccionados nas placas de Petri contendo o meio de cultura. Após a incubação por 24 h a 37° C, a atividade antibacteriana foi mensurada como o diâmetro da zona de inibição do crescimento e comparada com o controle negativo (salina). Todos os testes foram realizados em triplicata.

2. 10. Estudo de toxicidade aguda da PLS-Gi

Para avaliar a toxicidade aguda da PLS-Gi foi utilizado o método descrito pela Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD), *Guideline* 423 [35]. Foram utilizados camundongos Swiss, fêmeas, com peso variando entre 25-30 g. Os animais receberam PLS-Gi (2000 mg/kg, *v.o.*) dissolvido em salina, enquanto o grupo controle recebeu apenas solução salina por gavagem.

2.10.1. Observação de Sinais Clínicos

Após a administração da PLS-Gi (2000 mg/kg, *v.o.*), os animais foram observados por 30 minutos e durante as primeiras 24 horas, com atenção especial para as primeiras 4 horas, e depois diariamente, durante os 14 dias de duração do experimento. A observação das alterações comportamentais nos animais foi guiada pelo *screening hipocrático*, de acordo com o *Guideline* 423, que considera os seguintes critérios comportamentais a serem observados:

atividade geral, irritabilidade, reflexo palpebral, reflexo auricular, aperto da cauda, reflexo de endireitamento, força para agarrar, ataxia, anestesia, tremores, colvulsão, piloereção, ptose palpebral, cianose, defecação, lacrimação e morte. Além disso, o peso corporal dos animais foi monitorado durante todo o experimento.

2.10.2. Parâmetros Bioquímicos

Ao final do estudo de toxicidade aguda, os animais foram anestesiados com a combinação de Cloridrato de Xilazina (5 mg/kg *i.p.*) e Cloridrato de Cetamina (60 mg/kg *i.p.*). Após a anestesia, foi realizada a coleta de sangue por punção cardíaca, em seguida, as amostras obtidas foram armazenadas em tubos contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). As dosagens bioquímicas foram realizadas por meio de espectrofotometria, utilizando o analisador semi-automático – TEKNA. A avaliação da função hepática foi realizada por meio da quantificação da aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), e a função renal foi estimada através da dosagem da ureia. Todas as dosagens foram realizadas de acordo com as especificações do fabricante dos kits da Labtest Diagnosis (São Paulo, Brazil).

2.10.3. Peso relativo dos órgãos e análise histológica

Após a eutanásia dos camundongos, os órgãos (fígado, rins, coração e baço) foram removidos, em seguida, registrado os pesos. Posteriormente, o peso relativo dos órgãos foi calculado da seguinte forma:

$$\text{Peso do órgão/peso do corpo após o tratamento} \times 100.$$

Para a análise histológica, um seguimento de 3 cm dos órgãos mencionados acima foi fixado em formalina a 10%. Após a fixação, os tecidos foram desidratados em serie etanólica

crenente, clarificado em xileno, e embebido em parafina. Os blocos foram cortados (5- μm) e corados com hematoxilina-eosina (H & E), e observados ao microscópio óptico.

2.11. Análise estatística

Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M). As diferenças entre os grupos foram determinadas por meio da Análise da Variância (ANOVA), seguida pelo teste-t-Student-Newman-Keuls como *post hoc* teste ou teste t-Student. Para os dados não-paramétricos foi utilizado o teste de Kruskal-wallis, seguido do teste de Dunn's. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1. Análise Química

A extração da fração de polissacarídeos a partir de *G. intermedia* (PLS-Gi) foi realizada por digestão proteolítica, e 1,83 mg de polissacarídeos foi obtido a partir de 5 g de amostras secas de alga, correspondendo ao rendimento de 36,7%. Além disso, não foram detectadas proteínas na PLS-Gi. A espectroscopia de infravermelho foi usada como ferramenta para caracterizar a estrutura química da PLS-Gi. O espectro da FTIR é apresentado na Figura 12, expandido na região entre 1400 - 700 cm^{-1} , com bandas em 1376, 1258, 1071, 933, 890, e 819 cm^{-1} .

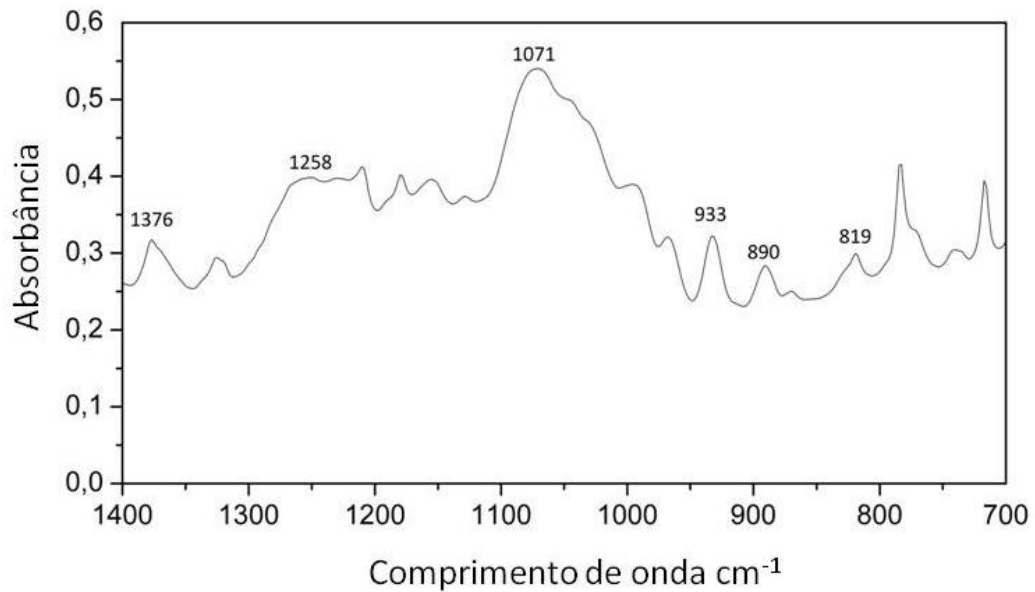


Figura 12. Espectro de Infravermelho da fração de polissacarídeos extraídos de *G. intermedia* (PLS-Gi) na região de número de onda entre 1400-700 cm^{-1} .

3.2. Avaliação da atividade antidiarreica da PLS-Gi na diarreia induzida com o óleo de rícino

Os resultados obtidos mostraram que a administração do óleo de rícino foi eficaz na indução da diarreia (Tabela 1). O pré-tratamento com PLS-Gi nas doses (3, 10, 30 mg/kg) reduziu de forma significativa ($p < 0,05$) a massa total de fezes ($9.65 \pm 0,01$ g; $3.32 \pm 0,003$ g; $1.3 \pm 0,004$ g) quando comparado ao grupo salina ($11,44 \pm 0,01$ g). A inibição da defecação para as doses testadas foi 15,64%; 79,97%; 88,63%, respectivamente. Além disso, a PLS-Gi reduziu a perda de fluidos quando comparada aos valores do grupo controle positivo, e a inibição da diarreia foi 16,35%; 72,41% e 91,00%, respectivamente.

Tabela 1. Efeito da fração de polissacarídeos sulfatados extraídos de *Gracilaria intermedia* (PLS-Gi, 3-30 mg/kg, v.o.) na diarreia induzida por óleo de rícino em camundongos.

Tratamento	Dose (v.o.)	Total de fezes (g)	Inibição da defecação (%)	Total de fezes diarreicas (g)	Inibição da diarreia (%)
Salina	2,5 (mL/kg)	11,44±0,01	--	11,13±0,005	--
PLS-Gi	3 (mg/kg)	9,65±0,01*	15,64	9,31±0,01*	16,35
	10	3,32±0,003*	79,97	3,07±0,01*	72,41
	30	1,3±0,004*	88,63	1,0±0,06*	91,00
Loperamida	5 (mg/kg)	0,95±0,01*	91,69	0,97±0,008*	91,28

Os valores estão expressos como média ± E.P.M (n = 5-6). ANOVA e Student-Newman-Keuls. *p <0,05 quando comparado ao grupo salina.

Do mesmo modo, o efeito da PLS-Gi na severidade da diarreia foi avaliado. A figura 13 mostra que o pré-tratamento com PLS-Gi (3 e 10 mg/kg) por gavagem, não produziram resultados com significância estatística quando comparados com o grupo controle positivo. Por outro lado, a PLS-Gi na dose de 30 mg/kg reduziu a severidade da diarreia de forma significativa (p<0,05) quando comparado ao grupo controle positivo. A droga antidiarreica padrão, loperamida (5 mg/kg), também diminuiu a produção de fezes diarreicas de forma significativa (p<0,05).

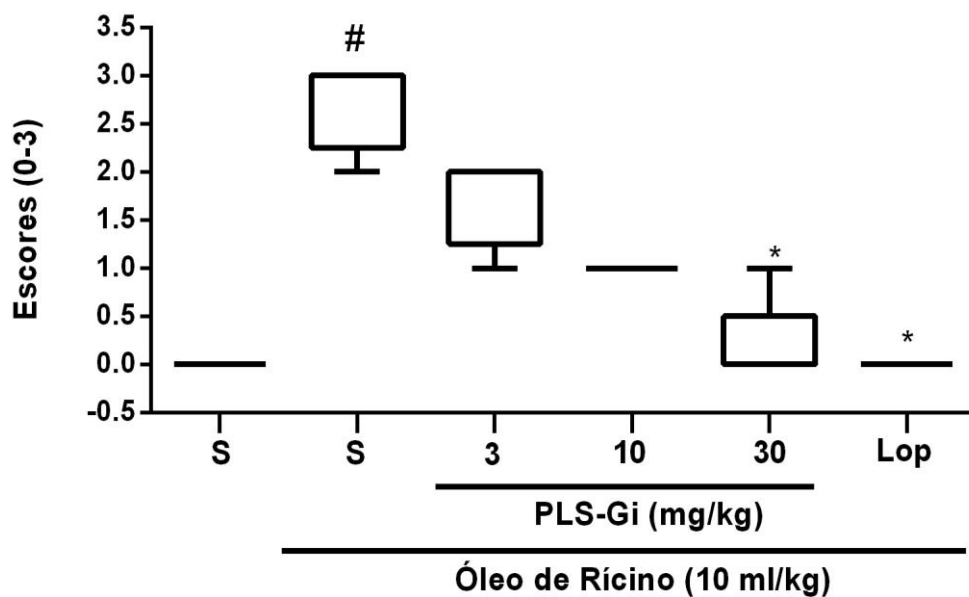


Figura 13. Efeito da fração de polissacarídeos sulfatados extraídos de *G. intermedia* (PLS-Gi) na fluidez das fezes. Após a administração do óleo de rícino (10 mL/kg, *v.o.*), o grupo controle produziu fezes diarreicas abundantes. O grupo pré-tratado com PLS-Gi (3, 10 mg/kg, *v.o.*) não produziu resultados com diferença estatística quando comparado ao grupo controle (salina + óleo de rícino), contudo, a PLS-Gi na dose de 30 mg/kg reduziu significativamente os escores de diarreia e diminuiu a severidade da diarreia quando comparado ao grupo controle. O medicamento antidiarreico padrão, loperamida (5 mg/kg, *v.o.*) diminuiu de forma significativa a fluidez das fezes. Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. Número de animais por grupo = 5-6. # $p < 0,05$ vs. grupo salina e * $p < 0,05$ vs. grupo controle (óleo de rícino + solução salina). (Kruskal-Wallis e Dunn). Abreviações: Lop = loperamida; PLS-Gi = fração de polissacarídeos sulfatados extraída de *G. intermedia*; Sal = solução salina.

3.3. Acúmulo de fluido intestinal induzido pelo óleo de rícino

Para avaliar o efeito da PLS-Gi no acúmulo do fluido intestinal durante o processo diarreico, o ensaio do *enteropooling* foi utilizado. A Tabela 2 mostra que o efeito do pré-tratamento com PLS-Gi no acúmulo do fluido intestinal durante o processo diarreico. A PLS-Gi (3 e 10 mg/kg) não reduziu o volume do conteúdo intestinal de forma significativa (8,51%; 10,63%, respectivamente) quando comparado com o grupo controle positivo tratado apenas com solução salina. Entretanto, a PLS-Gi (30 mg/kg) e a loperamida reduziram de forma significativa ($p < 0,05$) o volume do fluido intestinal (34,04%; 38,29%, respectivamente) quando comparado com o grupo controle positivo. Além disso, os resultados mostram que a dose mais efetiva da PLS-Gi foi 30 mg/kg, em seguida, essa foi usada como padrão para os outros experimentos.

Tabela 2. Efeito da fração de polissacarídeos sulfatados extraídos de *Gracilaria intermedia* (PLS-Gi, 3-30 mg/kg, *v.o.*) no acúmulo de fluidos intestinais (*enteropooling*) induzido pelo óleo de rícino em camundongos.

Tratamento	Dose (<i>v.o.</i>)	Conteúdo intestinal (mL)	Inibição do fluido intestinal (%)
Salina	2,5 (mL/kg)	0,47±0,04	--
PLS-Gi	3 (mg/kg)	0,43±0,04	8,51
	10	0,42±0,02	10,63
	30	0,31±0,01*	34,04
Loperamida	5 (mg/kg)	0,29±0,01*	38,29

Os valores estão expressos como média ± EPM (n = 5-6). ANOVA e Student-Newman-Keuls. * p<0,05 quando comparado ao grupo salina.

3.4. Determinação da atividade da Na⁺/K⁺ - ATPase do intestino delgado

Os resultados obtidos mostraram que o óleo de rícino reduziu a atividade da Na⁺/K⁺-ATPase (432,00 ± 54,57 μmol·mg⁻¹·h⁻¹) de forma significativa (p<0,05) quando comparado ao grupo salina (1158,00 ± 154,00 μmol·mg⁻¹·h⁻¹) (Figura 14). Entretanto, a atividade da Na⁺/K⁺-ATPase aumentou de forma significativa (p<0,05) no intestino delgado de animais pré-tratados com PLS-Gi (923,0 ± 102,1 μmol·mg⁻¹·h⁻¹) quando comparado com o grupo que recebeu óleo de rícino e salina. A loperamida (660,6 ± 99,93 μmol·mg⁻¹·h⁻¹) também aumentou a atividade dessa proteína. Esses resultados indicam que o tratamento com a PLS-Gi foi capaz de aumentar o a atividade enzimática, contribuindo para o efeito antidiarreico.

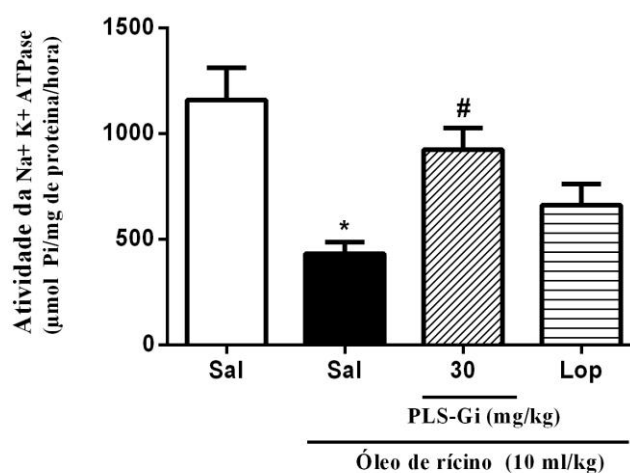


Figura. 14. Efeito da fração de polissacarídeos sulfatados extraídos de *G. intermedia* (PLS-Gi) na atividade da enzima Na⁺/K⁺-ATPase no intestino delgado de camundongos. A atividade da Na⁺/K⁺-ATPase do intestino delgado foi medida por meio da liberação de fosfato inorgânico a partir da hidrólise do trifosfato de adenosina (ATP). O pré-tratamento com PLS-Gi (30 mg/kg, *v.o.*) aumentou significativamente ($p < 0,05$) a atividade da Na⁺/K⁺-ATPase quando comparado ao grupo óleo de ricino. O medicamento antidiarreico padrão, loperamida (5 mg/kg, *v.o.*) não produziu resultados com diferença estatística quando comparado ao grupo controle (salina + óleo de ricino). Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. Número de animais por grupo = 5-6. # $p < 0,05$ vs. grupo salina + óleo de ricínio; * $p < 0,05$ vs. salina. ANOVA e teste Student-Newman-Keuls. Abreviações: Lop = loperamida; PLS-Gi = fração de polissacarídeos sulfatados extraídos de *G. intermedia*; Sal = solução salina.

3.5 Motilidade gastrointestinal

A distância percorrida pelo marcador (solução de carvão) através do intestino após a ingestão do óleo de ricino foi utilizada para avaliar o efeito da PLS-Gi no trânsito gastrointestinal. Os animais tratados com PLS-Gi ou loperamida reduziram de forma significativa ($p < 0,05$) a distância percorrida pelo marcador quando comparado ao grupo controle positivo (Figura 15 A). Os animais tratados com PLS-Gi ou loperamida tiveram as distâncias percorrida pelo marcador de 42,13% e 30,78%, respectivamente (Figura 15 A).

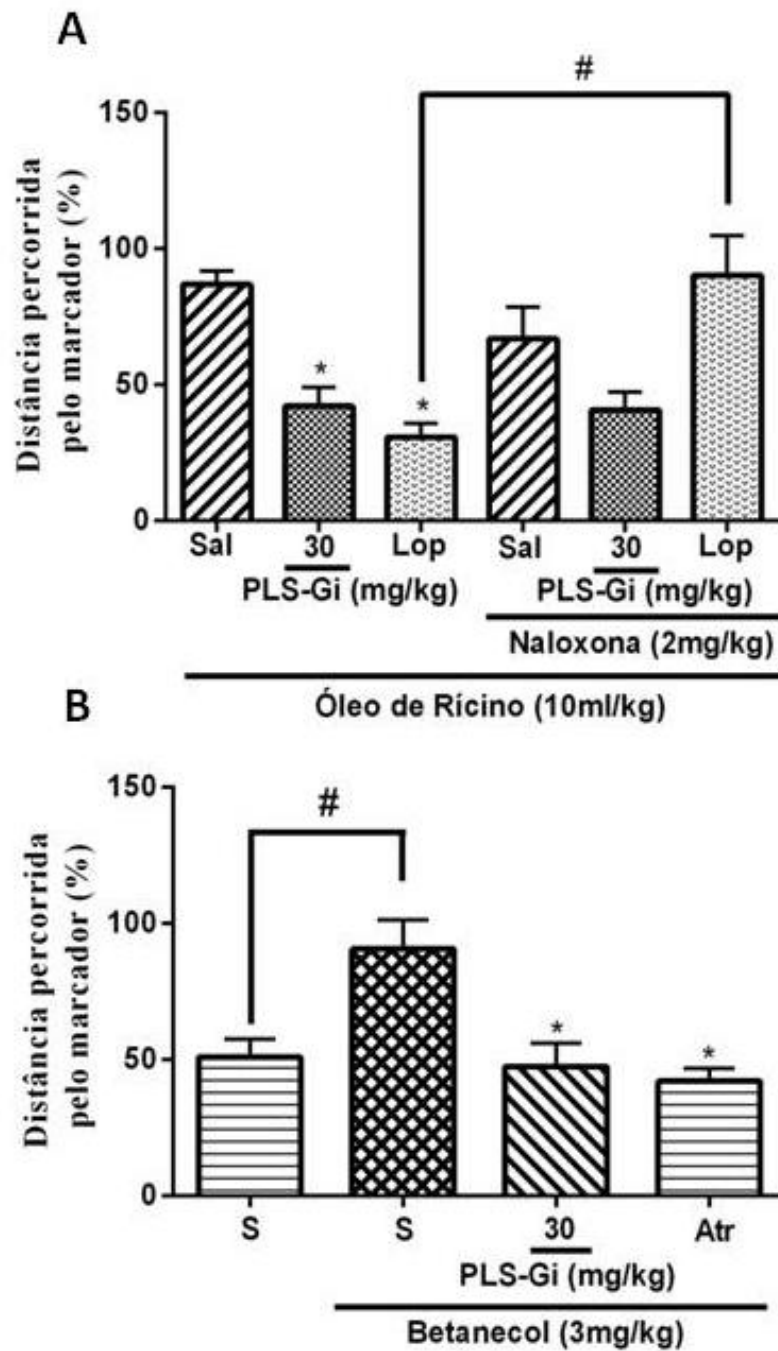


Figura 15. Efeito da fração de polissacarídeos sulfatados extraída de *G. intermedia* (PLS-Gi) no trânsito intestinal em camundongos. (A) Efeito da naloxona na atividade da PLS-Gi sobre o trânsito intestinal induzido por óleo de rícino em camundongos. Os animais receberam óleo de rícino para induzir diarreia. O tratamento com a PLS-Gi (30 mg/kg, *v.o.*) reduziu de forma significativa ($p < 0,05$) a

distância percorrida pelo marcador (carvão) através do intestino delgado. A loperamida (5 mg/kg, *v.o.*) teve um efeito antimotilidade similar. O pré-tratamento com a naloxona (2 mg/kg, *s.c.*) no grupo tratado com a PLS-Gi (30 mg/kg, *v.o.*) não reverteu seu efeito antimotilidade. Número de animais por grupo = 5-6. * $p < 0,05$ vs. grupo salino; # $p < 0,05$ loperamida + naloxona vs. loperamida sozinha. (B) O betanecol, um agonista colinérgico, aumentou de forma significativa ($p < 0,01$) a distância percorrida pelo marcador (carvão) através do intestino quando comparado ao grupo tratado apenas com solução salina. O pré-tratamento com PLS-Gi (30 mg/kg, *v.o.*) reverteu o efeito estimulador da betanecol (3 mg/kg, *i.p.*) no trânsito gastrointestinal em camundongos. A atropina (3 mg/kg, *s.c.*) teve um efeito similar ao da PLS-Gi. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. Número de animais por grupo = 5-6. ** $p < 0,05$ vs. grupo salina + betanecol; # $p < 0,05$ grupo salino vs. solução salina + betanecol. ANOVA e teste de Newman-Keuls. Abreviações: Lop = loperamida; PLS-Gi = fração de polissacarídeos sulfatados extraídos de *G. intermedia*; Sal = solução salina.

Além disso, na segunda etapa dos experimentos, um antagonista opioide não específico, naloxona, foi administrado para investigar o possível envolvimento de receptores opioides. O pré-tratamento com o antagonista opioide não impediu os efeitos do tratamento com a PLS-Gi (40,76%), embora tenha inibido a atividade da loperamida (90,33%), a droga padrão usada para o tratamento da diarreia, que altera o trânsito intestinal por interagir com receptores opioides do intestino (Figura 15 A).

No modelo de trânsito intestinal estimulado pelo betanecol, a distância percorrida pelo marcador no intestino (90,7%) aumentou de forma significativa ($p < 0,05$) quando comparada ao grupo tratado apenas com solução salina (51,08%). Os grupos de animais tratados com

PLS-Gi ou atropina tiveram distâncias (47,59% e 42,13%, respectivamente) significativamente menores ($p < 0,05$) que aquelas observadas para o grupo que recebeu apenas o betanecol (Figura 15 B), indicando que a PLS-Gi reduziu a motilidade intestinal por meio do bloqueio de receptores colinérgico do trato gastrointestinal.

3.6. Esvaziamento gástrico

A porcentagem de retenção gástrica do marcador mostrou que a administração da PLS-Gi não resultou em diferença significativa ($48,97 \pm 6,05\%$) quando comparado com o grupo que recebeu apenas solução salina ($55,06 \pm 2,81\%$) (Figura 16). Assim, esse resultado evidencia que a PLS-Gi não afeta o esvaziamento gástrico.

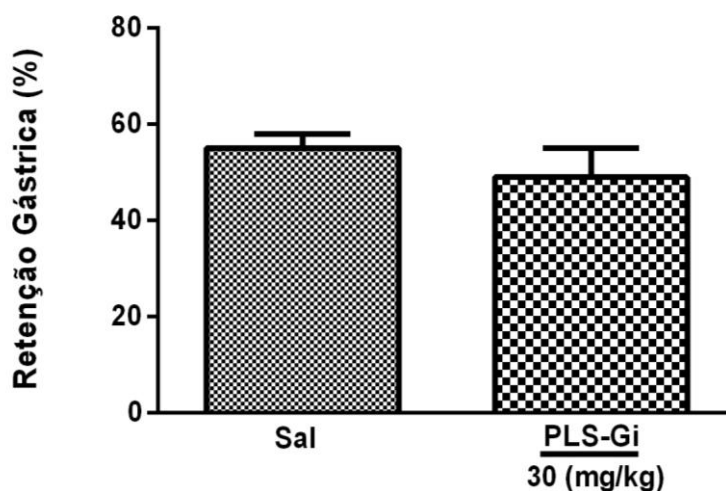


Figura 16. Efeito da fração de polissacarídeos sulfatados extraídos de *G. intermedia* (PLS-Gi) no esvaziamento gástrico. Observe que não há diferença estatística entre os grupos, mostrando que o pré-tratamento com a PLS-Gi (30 mg/kg, *v.o.*) não altera o esvaziamento gástrico. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. Número de animais por grupo = 5-6. ANOVA e

teste t de Student. Abreviações: PLS-Gi = fração de polissacarídeos sulfatados extraídos de *G. intermedia*; Sal = solução salina.

3.7. Avaliação da PLS-Gi na secreção intestinal induzida pela toxina da cólera em alças intestinais isoladas

O efeito da PLS-Gi na secreção intestinal foi testado usando o modelo de diarreia secretora induzida pela toxina da cólera em alças intestinal isoladas. Na Figura 17 A e 17 B, o acúmulo excessivo de fluidos foi observado nas alças intestinal que receberam a TC ($0,08 \pm 0,01$ g/cm) quando comparado ao grupo controle negativo, onde foi injetado apenas o PBS ($0,04 \pm 0,01$ g/cm). Os animais pré-tratados com PLS-Gi tiveram redução significativa ($p < 0,05$) no acúmulo de fluido intestinal induzido pela TC ($0,03 \pm 0,003$ g/cm) quando comparado com grupo que recebeu TC e solução salina. Os resultados indicam que a PLS-Gi inibe a secreção de fluido intestinal induzido pela TC.

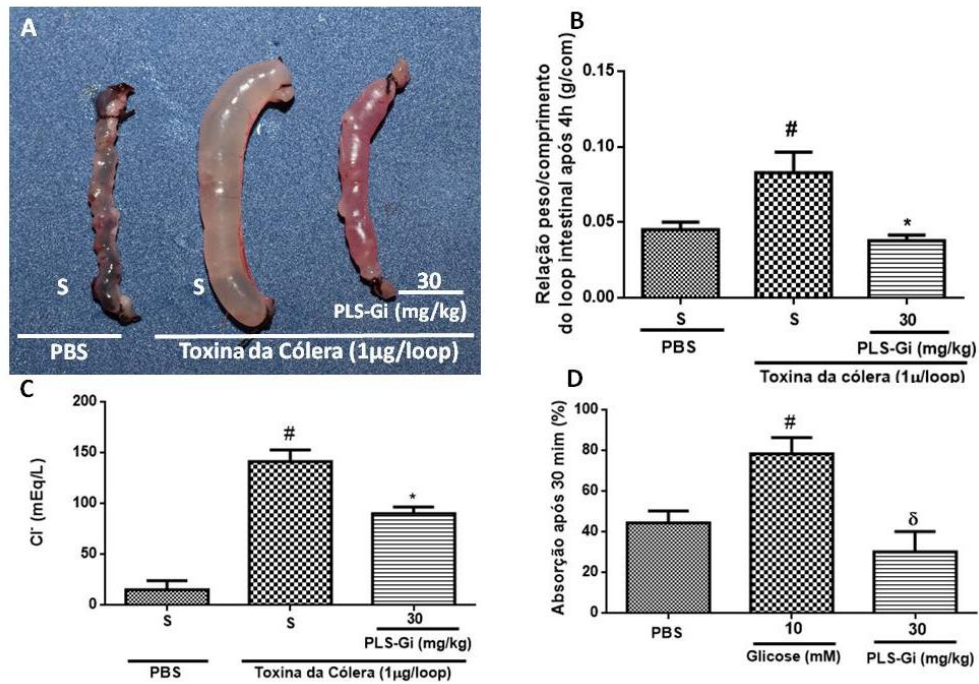


Figura 17. Efeito da fração de polissacarídeos sulfatados extraídos de *G. intermedia* (PLS-Gi) na secreção de fluidos induzida pela toxina da cólera (TC) em alças intestinais isoladas. (A) O pré-tratamento com a PLS-Gi (30 mg/kg, *v.o.*) reduziu de forma significativa ($p < 0,05$) o acúmulo de fluidos intestinais após a inoculação de TC (1 $\mu\text{g}/\text{loop}$) nas alças intestinais. (B) A PLS-Gi reduziu a secreção de fluidos que foi medida indiretamente por meio da relação peso/comprimento da alça (g/cm). (C) Os níveis de Cl⁻ do conteúdo intestinal dos animais pré-tratados com a PLS-Gi reduziu de forma significativa ($p < 0,05$). (D) A PLS-Gi não teve efeito sobre a absorção de fluidos intestinais, mostrado por meio da porcentagem de absorção após 30 minutos. Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. Número de animais por grupo = 5-6. # $p < 0,05$ vs. grupo PBS; * $p < 0,05$ vs. grupo CT; δ $p < 0,05$ vs. grupo glicose. ANOVA e teste de Newman-Keuls. Abreviaturas: PBS = solução salina tamponada com fosfato; PLS-Gi = fração de polissacarídeos sulfatados extraídos de *G. intermedia*; Sal = solução salina.

3.8. Determinação do efeito da PLS-Gi sobre a concentração de íons cloreto do fluido intestinal

Os resultados mostraram que a concentração de íons cloreto aumentou de forma significativa nas alças intestinais isoladas após a injeção da TC ($155,90 \pm 11,80$ mEq/L) quando comparada com os animais que receberam PBS ($14,94 \pm 9,04$ mEq/L). O tratamento com PLS-Gi diminuiu de forma significativa ($p < 0,05$) os níveis de cloreto nas alças intestinais ($100,60 \pm 7,25$ mEq/L) (Figura 17 C). Esses resultados mostram que a PLS-Gi reduz as características da diarreia induzida pela TC, como o efluxo excessivo de íons cloreto para o lúmen intestinal.

3.9. Efeito da PLS-Gi sobre a absorção de fluidos em alças intestinais isoladas

O efeito da PLS-Gi na porcentagem de absorção do fluido intestinal em alças intestinais isoladas foi avaliado. Na figura 17 D, pode ser observado que a absorção do fluido intestino no controle positivo (glicose) foi de $78,25 \pm 8,06\%$. A figura 6D mostra que a PLS-Gi não afetou a absorção de fluidos das alças intestinais ($30,00 \pm 10,00\%$), resultado semelhante ao observado no grupo controle negativo ($44,26 \pm 5,91\%$). Esses resultados indicam a inibição da secreção induzida pela TC após o tratamento com PLS-Gi é provavelmente mediado por outro mecanismo.

3.10. Ensaio ELISA-GM1

Para avaliar a possível interação da PLS-Gi com a TC e/ou receptores GM1 o teste de ELISA foi realizado. Os resultados mostraram que a incubação do GM1 com PLS-Gi ($100 \mu\text{g/ml}$) reduziu de forma significativa ($p < 0,001$) a detecção da TC, e sugere que a PLS-Gi interage com o GM1 (Figura 18, coluna b). Esse resultado corrobora com a diminuição dos

níveis da TC quando a PLS-Gi foi adicionada simultaneamente com a toxina nos poços previamente incubados com o GM1 (Figura 18, coluna c-h). A quantidade de TC detectada diminuiu de forma significativa ($p < 0,001$) em todas as concentrações de PLS-Gi testadas. Esses resultados sugerem que a PLS-Gi pode interagir com o GM1 e com a TC.

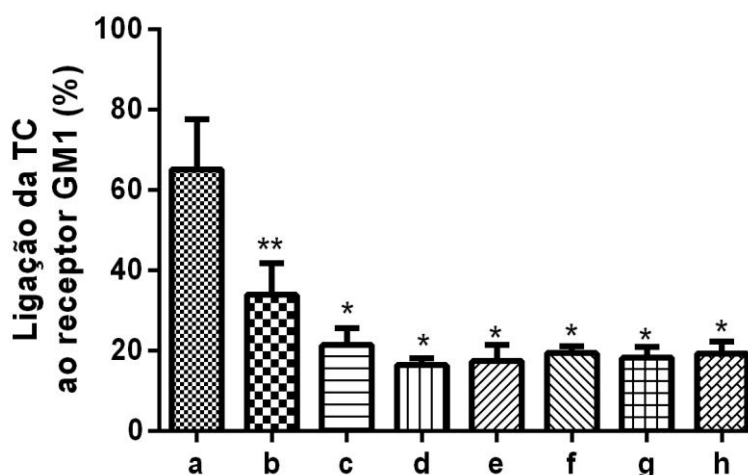


Figura 18. Efeito da fração de polissacarídeos sulfatados extraídos de *G. intermedia* (PLS-Gi) sobre a ligação da toxina da cólera (TC) ao receptor GM1. A TC (100 ng) foi incubada sozinha (coluna a) ou com a PLS-Gi (1, 10, 50, 100, 300 ou 500 mg/mL) (colunas c-h, respectivamente), em seguida, a quantidade de TC foi estimada por meio do ELISA. Os poços revestidos com GM1 foram pré-incubados com a PLS-Gi (coluna b) e lavados, em seguida, a TC (100 ng) foi adicionada aos poços e a quantidade de toxina foi estimada por meio do ELISA. Os valores obtidos para a TC (100 ng) foram ajustados para 100% de ligação. Os dados apresentados são médias \pm E.P.M de experimentos independentes, realizados em triplicata e condições semelhantes. * $p < 0,001$ vs. coluna a. ANOVA e teste de Newman-Keuls.

3.11. Avaliação da PLS-Gi na diarreia induzida pela ETEC

O tratamento com a PLS-Gi diminuiu de forma significativa ($p < 0,05$) o total de fezes quando comparado com o grupo controle positivo (salina + *E. coli*). A inibição da diarreia no grupo tratado com a PLS-Gi foi de 46,08% e no grupo tratado com a gentamicina foi de 66,40% (Tabela 3).

Tabela 3. Efeito da fração de polissacarídeos sulfatados extraídos de *Gracilaria intermedia* (PLS-Gi, 30 mg/kg, v.o.) na diarreia induzida por *Escherichia coli* enterotoxigênica em camundongos.

Tratamento	Total de fezes (g)			Inibição da diarreia (%)
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	
Salina	8,65 ± 1,26	13,41 ± 2,03	15,38 ± 1,85	--
PLS-Gi	4,42 ± 0,78*	7,63 ± 1,24*	8,14 ± 1,33	46,08
Gentamicina	2,35 ± 1,79*	5,16 ± 1,57*	5,07 ± 1,06*	66,40

Os valores estão expressos como média ± E.P.M (n = 5-6). ANOVA e Student-Newman-Keuls. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo salina.

Além disso, no terceiro dia, foi observado que o tratamento com a PLS-Gi ou gentamicina preveniu de forma significativo ($p < 0,05$) a perda de peso dos animais (2,7 g e 1,8 g, respectivamente) quando comparado ao grupo controle positivo (salina + *E. coli*) (5,7 g) (Tabela 4).

Tabela 4. Efeito dos polissacarídeos sulfatados extraídos de *Gracilaria intermedia* (PLS-Gi, 30 mg/kg, v.o.) no peso corporal mediante a indução de diarreia com *Escherichia coli* enterotoxigênica em camundongos.

Tratamento	Peso corporal (g)		Peso perdido (g)
	Dia 0	Dia 3	
Salina	27,5 ± 2,1	29,8 ± 1,6	--
Salina + <i>E. coli</i>	28,3 ± 1,6	22,6 ± 1,1	5,7*
PLS-Gi	27,7 ± 1,9	25,0 ± 0,8	2,7 [#]
Gentamicina	26,9 ± 1,2	25,1 ± 0,6	1,8 [#]

Os valores estão expressos como média ± EPM (n = 5-6). ANOVA and Student Newman-Keuls test. * p<0,05 vs. Salina. [#]p<0,05 vs. Salina + *E.coli*.

3.12. Avaliação da atividade antimicrobiana contra cepas de *E. coli*

A atividade antimicrobiana da PLS-Gi foi testada contra cepas de *E. coli* (ATCC 25922) usando o método de difusão em ágar. Os resultados obtidos mostraram a ausência de halo de inibição nas doses (10, 30 e 50 mg/mL) (Figura 19). Desse modo, esses resultados sugerem que essas concentrações da PLS-Gi não exerce atividade antimicrobiana contra *E. coli*.

Figura 19. Efeito da fração de polissacarídeos sulfatados extraída de *Gracilaria intermedia* sobre o crescimento de *Escherichia coli* in vitro

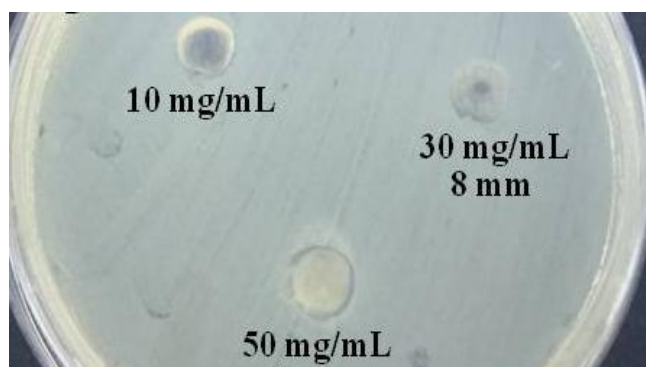


Foto da placa de petri contendo o Ágar Müeller Hinton, previamente inoculadas com 100 µL de suspensão contendo 10⁸ UFC/ml. Após o período de incubação, os poços confeccionados no meio foram preenchidos com 100 µL da PLS-Gi (10, 30, 50 mg/mL) sobre *E.coli*. Na avaliação da atividade antimicrobiana dos PLS sobre a *E.coli* nas

concentrações de 10, 30 e 50 mg/mL não houve formação de um halo de inibição.

3.13. Teste de toxicidade oral aguda

Nesse estudo, não foi observado morte ou sinais de toxicidade nos animais tratados com a dose de 2000 mg/kg. Além disso, em relação ao peso do corporal dos animais após 14 dias consecutivos, não houve diferença significativa entre os grupos controle e tratado com a PLS-Gi (resultados não apresentados).

Ademais, os níveis plasmáticos da aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) (marcadores da função hepática), e uréia (indicador da função renal) do grupo tratado com a PLS-Gi não apresentaram diferença significativa quando comparado ao grupo controle (Tabela 5).

Tabela 5. Efeito da fração de polissacarídeos sulfatados extraídos de *Gracilaria intermédia* (PLS-Gi, 2.000 mg/kg, v.o.) nos parâmetros bioquímicos de camundongos.

Parâmetro	Controle	PLS-Gi (2.000 mg/kg, v.o.)
Uréia (mg/dL)	38.97±0.35	39.56±3.01
AST (U/L)	56.50±4.95	60.50±7.77
ALT (U/L)	76.50±6.36	82.00±4.24

Os valores estão expressos como média ± EPM. Teste t-Student. Aspartato aminotranferase (AST), Alanina aminotranferase (ALT).

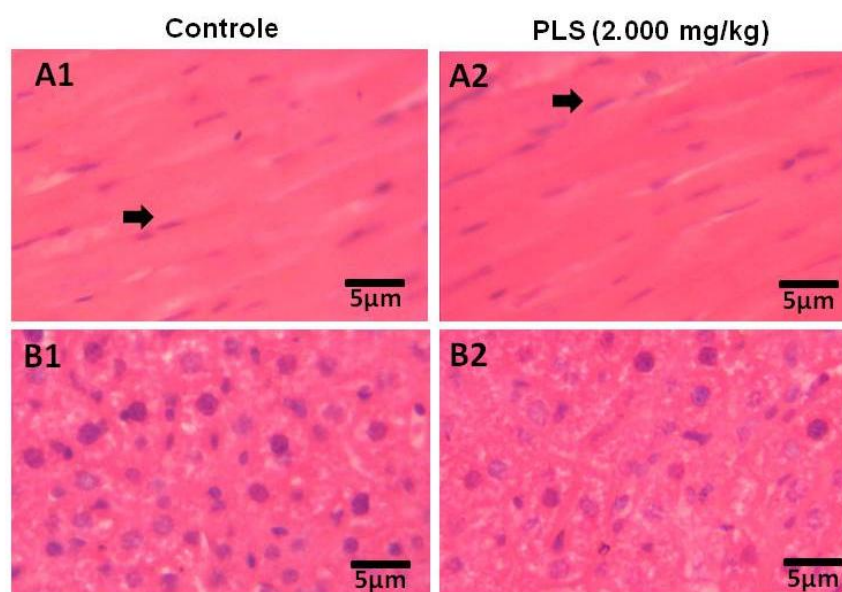
Em relação a avaliação dos pesos dos órgãos (fígado, rins, coração e baço), não foi observada diferença significativa entre o grupo tratado com a PLS-Gi e o grupo controle (Tabela 6). Do mesmo modo, a análise histológica desses órgãos revelou a ausência de alterações patológicas entre os grupos (Figura 20, 21 e 22).

Tabela 6. Efeito da fração de polissacarídeos sulfatados extraídos de *Gracilaria intermedia* (PLS-Gi, 2.000 mg/kg, v.o.) no peso corporal (g) e no peso relativo dos órgãos de camundongos.

Tratamento	Peso corporal (g)		Peso relativo dos órgãos (%)			
	Antes	Depois	Fígado	Coração	Rins	Baço
Controle	29,00±1,000	29,07±1,392	3,945±0,231	0,463±0,055	1,110±0,092	0,378±0,015
PLS-Gi	29,00±0,577	28,54±0,981	3,644±0,225	0,416±0,027	0,9742±0,009	0,405±0,094

Os valores estão expressos como média ± EPM (n = 3). Teste t-Student.

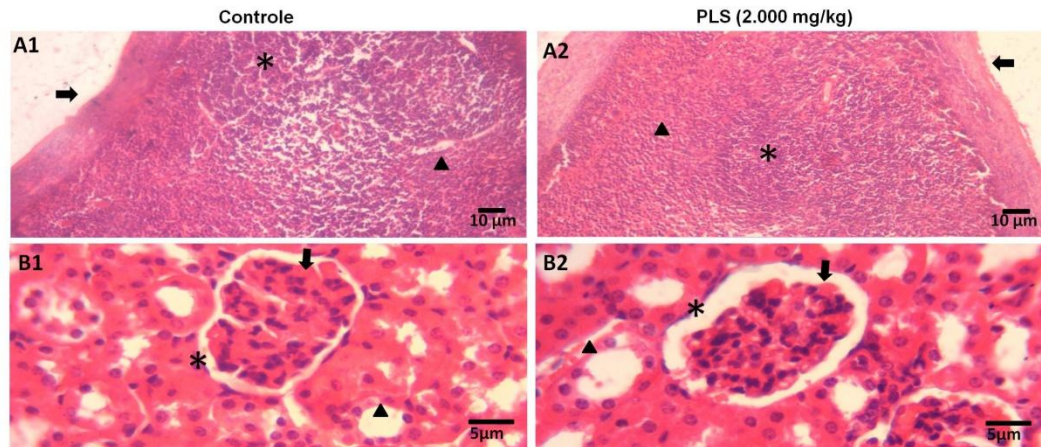
Figura 20. Secções histológicas coradas por hematoxilina e eosina do coração (A1 e A2) e fígado (B1 e B2) de camundongos após a administração da PLS-Gi (2.000 mg/kg, v.o.).



A. Fotomicrografia de miocárdio, grupos controle (salina, v.o.) (A1) e PLS-Gi (A2), observe a presença dos feixes de fibras musculares cardíacas alongadas com um ou dois núcleos (seta) nos em objetiva de 40x.

B. Secções histológicas de fígado, grupo controle (salina, v.o.) (B1) e PLS-Gi (B2), mostrando hepatócitos com citoplasma preservado e sem alterações nucleares em objetiva de 40x.

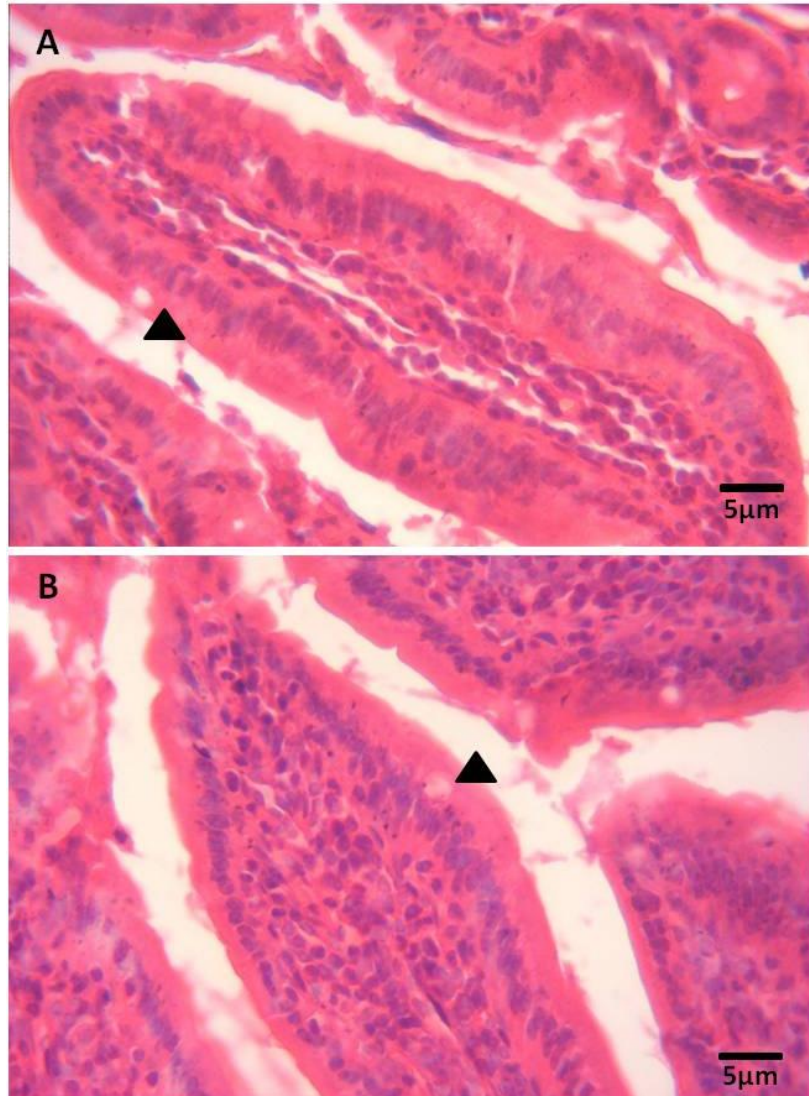
Figura 21. Secções histológicas coradas por hematoxilina e eosina do baço (A1 e A2), e rim (B1 e B2) de camundongos após a administração da PLS-Gi (2.000 mg/kg, *v.o.*).



A. Fotomicrografia do baço, grupo controle (salina, *v.o.*) (A1) e grupo PLS-Gi (A2), ambos apresentando arquitetura normal. Observe o órgão envolvido por cápsula de tecido conjuntivo denso (seta), a qual origina septos que divide o parênquima em compartimentos incompletos, denominados polpa branca (asterisco) e polpa vermelha (cabeça de seta), objetiva de 10x.

B. Fotomicrografia de rim, região cortical, grupo controle (salina, *v.o.*) (B1) e PLS-Gi (B2), observe o aspecto normal dos glomérulos (seta), da capsula de Bowman (asterisco), separados pelo espaço capsular preservado, e a integridade dos túbulos contorcidos proximais (cabeça de seta), objetiva de 40x.

Figura 22. Fotomicrografia de vilosidades do intestino delgado de camundongos após a administração da PLS-Gi (2.000 mg/kg, v.o.).



Detalhe da vilosidade intestinal revestida por epitélio cilíndrico simples contendo células caliciformes (ponta da seta), grupo controle (salina, v.o.) (A) e grupo tratado com polissacarídeos sulfatados extraídos da alga marinha *Gracilaria intermedia* (B) após 14 dias consecutivos, objetiva de 40x.

4. Discussão

No presente estudo, a fração de polissacarídeos sulfatados obtidos a partir da alga marinha vermelha *G. intermedia* (PLS-Gi) foi extraída em água quente com a digestão enzimática realizada por papaína. O rendimento obtido corrobora os dados obtidos em estudos com outras espécies de algas do mesmo gênero [17, 36, 37]. Além disso, o tratamento proteolítico foi eficaz na remoção de proteínas contaminantes na fração analisada. Esse resultado está de acordo com outros dados de estudos anteriores, cujos achados mostraram que a digestão proteolítica durante a extração de polissacarídeos a partir de algas marinhas elimina os resíduos de proteínas que poderiam interferir nos ensaios biológicos [38, 39].

O espectro de infravermelho da PLS-Gi revelou bandas com números de onda característicos de polissacarídeos de algas (1071, 933 e 890 cm^{-1}) [40, 41, 42, 43]. A banda com número de onda de 1376 é atribuída ao grupo éster de sulfato, a banda 1258 cm^{-1} está relacionada ao estiramento assimétrico do grupo (O = S = O) e a banda 1071 cm^{-1} é indicativa da presença de esqueleto carbônico de polissacarídeos do tipo galactana [44]. Além disso, a absorção em 933 cm^{-1} indica a presença do grupo C-O-C em 3,6-anidrogalactose [17, 43]. Geralmente, em polissacarídeos do tipo ágar, a presença de bandas na região entre 800-850 cm^{-1} é usada para inferir a posição de grupamentos sulfatados. Desse modo, a absorção em 821 cm^{-1} sugere a presença de sulfatação no C-6 dos resíduos de L-galactose, o precursor biológico de 3,6-anidro-L-galactose [45].

Nos últimos anos, os polissacarídeos sulfatados obtidos a partir de algas marinhas tem chamado atenção devido ao seu potencial terapêutico, como a atividade antidiarreica [14, 15, 46]. Desse modo, considerando que existem poucos estudos investigando o potencial terapêutico de polissacarídeos sulfatados de origem marinha em doenças do trato

gastrintestinal, estudos detalhados são necessários para permitir a adoção de novas terapias e medidas profiláticas.

No presente estudo, os resultados obtidos indicam que a PLS-Gi possui atividade antidiarreica em camundongos. Inicialmente, o modelo de diarreia induzida com o óleo de rícino foi usado para avaliar o efeito antidiarreica da PLS-Gi. O óleo de rícino é um laxante extraído das sementes de *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) amplamente usado para investigar a propriedade antidiarreica de substâncias [47, 48]. O efeito laxativo desse óleo é atribuído ao princípio ativo, o ácido ricinoleico, um irritante da mucosa intestinal, que promove a liberação de prostaglandinas [49, 50], histaminas [51], fator ativador plaquetário [52] e óxido nítrico [53]. O ácido ricinoleico também ativa a adenilato ciclase, que promove o aumento de adenosina monofosfato cíclico (AMPC) na mucosa, e altera o transporte de eletrólitos [54]. Desse modo, o óleo de rícino induz a modificações na permeabilidade de eletrólitos e água na membrana da mucosa intestinal, e aumenta a motilidade intestinal [55].

Nesse contexto, nossos resultados mostraram que a PLS-Gi reduziu a quantidade total de fezes e a severidade da diarreia. Além disso, os efeitos observados foram similares ao observados para a loperamida, uma droga antidiarreica que controla a diarreia induzida pelo óleo de rícino devido as suas propriedades antimotilidade e antissecretora [56, 57]. Desse modo, é possível que o efeito inibitório da PLS-Gi na diarreia induzida pelo óleo de rícino ocorra devido a inibição de algum mediador envolvido no mecanismo de ação do óleo de rícino, que afete o acúmulo de fluidos no lúmen intestinal e/ou interfira no peristaltismo intestinal, e conseqüentemente, modifique a permeabilidade das células da mucosa.

A administração do óleo de rícino também promove o acúmulo de água e eletrólitos por alterar a permeabilidade da mucosa e o transporte de eletrólitos (Na^+ e Cl^-) levando a hipersecreção e diarreia [58]. Esse efeito foi avaliado usando o modelo do *enteropooling*.

Nossos resultados mostraram que a PLS-Gi reduziu o volume do conteúdo intestinal. Assim, a redução do acúmulo do conteúdo do fluido intestinal provocado pela PLS-Gi pode ser devido a um mecanismo antissecretor associado ao transporte de eletrólitos e água.

Os estudos tem demonstrado que o óleo de rícino interfere na atividade da Na^+/K^+ -ATPase no intestino, inibindo o funcionamento dessa proteína e contribuindo para o acúmulo de fluidos [59, 60]. Ademais, nossos resultados mostraram o aumento da atividade da Na^+/K^+ -ATPase no intestino delgado de camundongos pré-tratados com a PLS-Gi quando comparado ao grupo óleo de rícino. Logo, o aumento da atividade dessa enzima pode contribuir com o efeito *enteropooling* por meio da diminuição do acúmulo de fluido intestinal. Assim, o aumento da atividade da Na^+/K^+ -ATPase pode ser um dos mecanismos da PLS-Gi como agente antidiarreico. Entretanto, essa hipótese não exclui a possibilidade da PLS-Gi atuar por outro mecanismo para exercer atividade antidiarreica.

O efeito de drogas na motilidade gastrointestinal pode ser avaliado por meio da distância percorrida por um marcador (carvão) no intestino [26]. Nesse estudo, esse método foi usado para avaliar a influência da PLS-Gi no trânsito gastrointestinal. Nossos resultados mostraram que o tratamento de animais com a PLS-Gi reduziu o trânsito gastrointestinal no modelo de diarreia induzida com o óleo de rícino quando comparado aos controles. Ademais, o grupo tratado com a loperamida exibiu efeito antimotilidade similar ao grupo PLS-Gi.

A loperamida inibe a motilidade gastrointestinal e, conseqüentemente, aumenta a absorção do fluido intestinal por interagir com receptores opioides do intestino [25, 61]. Assim, considerando a similaridade dos resultados observados, na etapa seguinte foi avaliado o possível envolvimento dos receptores opioides no mecanismo de ação da PLS-Gi. Com esse propósito, os animais foram tratados com naloxona, um antagonista opioide, antes da indução da diarreia com o óleo de rícino. Os resultados obtidos mostraram que a naloxona

antagonizou o efeito da loperamida, mas não foi capaz de reverter o efeito da PLS-Gi. Logo, o efeito antidiarreico da PLS-Gi não é dependente de mecanismo opioide, resultado semelhante tem sido observado para polissacarídeos sulfatados extraídos das algas marinhas vermelhas *Hypnea musciformis* e *G. caudata* [14, 15]. Portanto, a PLS-Gi diminui o trânsito gastrointestinal por outro mecanismo que tem a capacidade de modular a motilidade gastrointestinal.

De modo semelhante, a possível atividade anticolinérgica da PLS-Gi na redução do trânsito gastrointestinal induzido pelo betanecol foi investigado. O betanecol é uma agonista colinérgico que estimula a contração dos músculos intestinais por ativar os receptores colinérgicos muscarínicos [62]. No presente estudo, a PLS-Gi bloqueou o efeito do betanecol. O efeito observado foi similar ao da atropina, um antagonista de receptores colinérgicos muscarínicos usado como droga padrão. Desse modo, é possível que a PLS-Gi reduza motilidade intestinal por meio do bloqueio de receptores muscarínicos, atuando como um antagonista. Além disso, para avaliar se o efeito inibitório da PLS-Gi ocorre a nível de estômago e/ou intestino, o modelo do esvaziamento gástrico foi realizado. Esse modelo utiliza a fração do marcador retida por segmento (estômago e/ou intestino) e tem sido utilizado por outros autores [63, 64]. Nossos resultados mostraram que a PLS-Gi teve baixo ou nenhum efeito sobre a motilidade gástrica. Assim, o efeito inibitório da PLS-Gi no trato gastrointestinal ocorre somente a nível de intestino.

Ademais, o modelo de diarreia induzida pela TC foi utilizado para investigar a possível atividade secretora da PLS-Gi. A TC é formada por duas subunidades A e cinco subunidades B, essenciais para a ligação da toxina aos GM1 na superfície dos enterócitos [65]. Após a ligação da toxina, uma cascata envolvendo proteína G, adenilato ciclase, AMPc, e PKA promovem o efluxo de Cl⁻ associado a perda maciça de água [66, 67, 68]. Os

resultados obtidos demonstraram que a PLS-Gi teve um efeito inibitório na secreção de fluidos induzida pela TC, reduzindo a perda de água e a concentração de Cl^- no lúmen intestinal. Em seguida, foi investigado se o envolvimento da PLS-Gi na redução do acúmulo do fluido intestinal depende de mecanismos relacionados ao processo de absorção. Contudo, a PLS-Gi não exerceu efeito sobre a absorção de fluido intestinal, indicando que a PLS-Gi atua por outro mecanismo na redução da perda de fluidos. Resultados similares foram observados por Araújo et al. [69] para a goma do cajueiro, um complexo de heteropolissacarídeos extraídos do exsudato de *Anacardium occidentale*.

Em seguida, considerando que a ligação da TC ao GM1 é a primeira etapa na patogênese da cólera, esse alvo tem sido explorado para o desenvolvimento de drogas para o tratamento e profilaxia dessa doença [70]. Estudos têm demonstrado que análogos da galactose interferem na ligação da TC com o GM1 [71, 72, 73]. Diante desses dados, foi investigada a capacidade da PLS-Gi de interferir na ligação da toxina ao GM1. Os resultados obtidos mostraram que a pré-incubação da PLS-Gi com os receptores GM1 reduziu a ligação da TC. De acordo com a caracterização química de polissacarídeos sulfatados extraídos de algas do gênero *Gracilaria*, esses compostos têm como constituintes básicos monômeros de D-galactose [12, 74]. Assim, é possível que a interação entre os monômeros de D-galactose presentes na PLS-Gi promova o bloqueio dos sítios de ligação da toxina no GM1, validando essa fração como um possível antagonista competitivo de receptores GM1. Além disso, quando a TC e a PLS-Gi foram adicionadas simultaneamente aos poços contendo GM1, a ligação da TC ao GM1 diminuiu em todas as concentrações testadas, sugerindo a interação entre polissacarídeos e toxina. Em conjunto, esses resultados corroboram os obtidos por Costa et al. [14], que sugerem que os polissacarídeos sulfatados extraídos de *G.caudata* pode interagir com ambos, GM1 e TC.

A TC possui uma sequência de aminoácidos homóloga a toxina termo label (TL) produzida pela ETEC [75]. Além disso, essa toxina também se liga ao GM1 presente no epitélio do intestino e, subsequentemente, estimula a síntese de AMPc, que inicia uma cascata e ativa a secreção de eletrólitos e fluidos para o lúmen intestinal [76]. Desse modo, devido a similaridade estrutural e patogênese entre essas toxinas, e considerando a eficácia da PLS-Gi no controle da diarreia induzida pela TC, a ação dessa fração polissacarídica foi investigada no modelo de diarreia induzida pela ETEC. Assim, os resultados obtidos mostraram que a fração de polissacarídeos não apenas reduziu a quantidade total de fezes diarreicas, como preveniu a perda de peso dos animais. Assim, a PLS-Gi pode exercer atividade antidiarreica por interferir na ligação da TL com o GM1, provavelmente devido à presença de monômeros de galactose na sua estrutura. Além disso, estudos têm demonstrado que a galactose inibe a ligação da TL ao GM1 [70, 77].

As cepas de ETEC também podem produzir uma toxina estável ao calor (TS). Existem variantes da TS, como o subtipo TSbP que está envolvido na indução de diarreia secretora em animais, incluindo humanos. Essa toxina se liga a regiões que contêm receptores (3'-sulfogalactosil-ceramida) presentes na parede celular do epitélio intestinal [78]. A inibição da ligação da TSbP ao seu receptor foi observada após a administração de polissacarídeos sulfatados extraídos de alga marinha, tipo λ -carragenana, um polímero constituído por unidades de galactose sulfatada [79]. Assim, considerando que as espécies do gênero *Gracilaria* produzem principalmente ágar, uma galactana sulfatada com a mesma estrutura linear de polissacarídeos tipo carragenana [80], é possível que a PLS-Gi possa mimetizar o receptor dessa toxina, prevenindo e controlando esse tipo diarreia em animais.

Em seguida, devido à atividade antidiarreica da PLS-Gi na diarreia induzida por *E. coli*, foi avaliada a possível atividade antimicrobiana dessa fração de polissacarídeos. No

entanto, a inibição do crescimento de *E. coli* por SP-Gi não foi observada. Por outro lado, Amorim et al [12] observaram um efeito inibitório de polissacarídeos sulfatados extraídos de algas *G. ornata* contra *E. coli* em meio líquido. Em vista disso, a ausência de efeito inibitório pode ser devido a variações estruturais e conformacionais em polissacarídeos sulfatados. O peso molecular, a densidade de carga e/ou a distribuição dos grupos sulfato têm um papel importante na sua atividade biológica [81]. Além disso, a ausência de antimicrobiana por polissacarídeos sulfatados obtidos a partir de algas marinhas pode ser atribuída à repulsão entre a carga dos grupos sulfatados e a parede celular da bactéria e/ou produção de enzimas pela bactéria capaz de remover os polissacarídeos da superfície celular [82].

Atualmente, as drogas disponíveis para tratamento das diarreias embora eficazes, apresentam variados efeitos adversos. A loperamida, por exemplo, pode causar problemas respiratórios, cardíacos, e até morte [83]. Nesse estudo, para avaliar a toxicidade da PLS-Gi, seguimos as recomendações do *Guideline 423* (2001) da OCDE [35]. De acordo com esse protocolo, quando as informações disponíveis na literatura sugerem que a mortalidade é improvável em altas doses [74, 84, 85], o teste limite pode ser realizado. Desse modo, o estudo da toxicidade a PLS-Gi foi conduzido com a dose mais alta, e não foi observada morte ou alterações clínicas e comportamentais. Do mesmo modo, nenhum sinal significativo de toxicidade foi observado para polissacarídeos sulfatados isolados de algas vermelhas *Solieria filiformis* [84].

Além disso, foi observado que a PLS-Gi não alterou o peso corporal dos animais e o peso relativo dos órgãos, ambos, fatores importantes no estudo da toxicidade. A análise histológica do coração, baço, fígado, rim, órgãos sensíveis e/ou importante no metabolismo e excreção de xenobióticos, não apresentaram alterações significativas entre os grupos.

Resultados similares foram observados para polissacarídeos sulfatados obtidos de *G. birdae* [74]. Em conjunto, esses resultados sugerem baixa toxicidade da PLS-Gi.

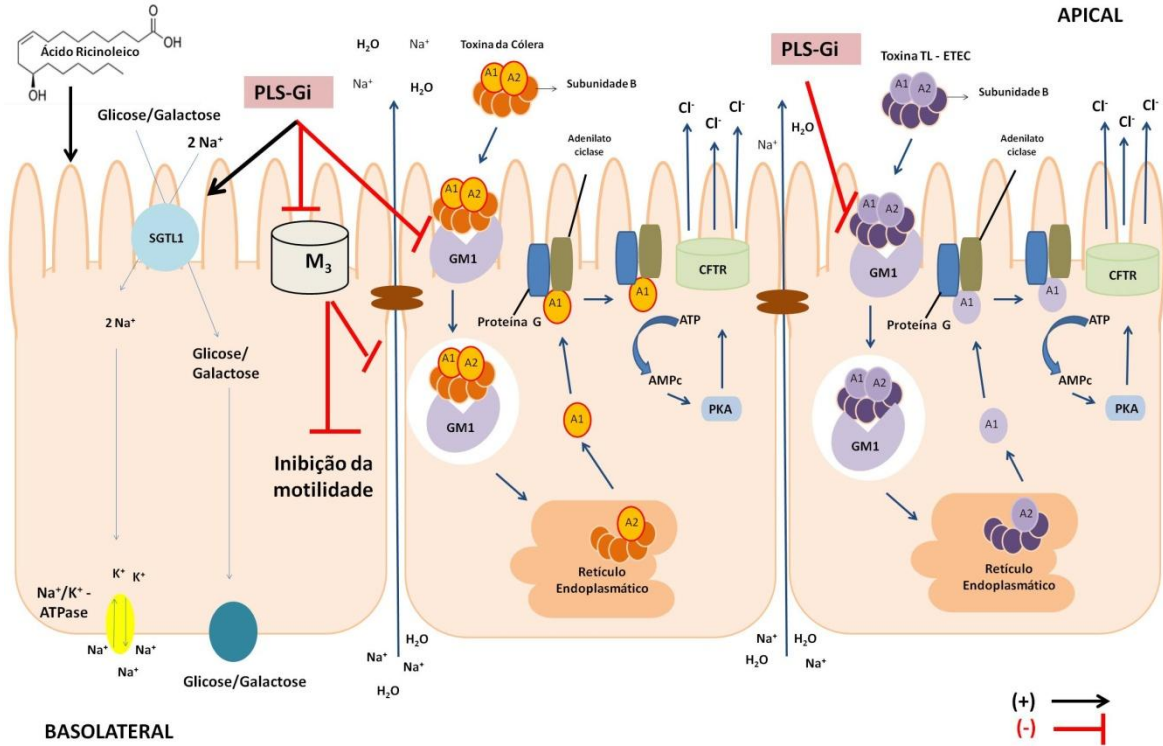
A resposta do corpo a substâncias tóxicas também é manifestada por mudanças fisiológicas, portanto, testes que avaliam a presença de lesão hepática como AST e ALT são úteis para determinar a extensão do dano a esse órgão [85]. Da mesma forma, a ureia é utilizada como um indicador da função renal [86]. Nesse estudo, não foi observada alteração nos níveis de AST, ALT e ureia de camundongos tratados, corroborando os resultados obtidos na análise histológica do fígado e dos rins. De modo semelhante, Coura et al. [87] não observaram mudanças significativas nesses parâmetros ao avaliar os efeitos de polissacarídeos sulfatados extraídos de *G. cornea*.

De acordo com o protocolo 423 da OCDE, a PLS-Gi pode ser classificada na categoria 5 (substância com DL₅₀ superior a 2000 mg/kg) do Sistema Global Harmonizado (GHS). Desse modo, a próxima dose a ser testada seria de 5000 mg/kg. No entanto, o estudo dessa dose só é recomendado em casos excepcionais [35].

5. Conclusão

Os resultados obtidos nesse estudo sugerem que os polissacarídeos sulfatados obtidos a partir da alga *G. intermedia* têm atividade antidiarreica em camundongos, alterando os parâmetros fecais, inibindo o *enteropooling*, estimulando a atividade da Na⁺/K⁺-ATPase nos enterócitos e reduzindo a motilidade gastrointestinal, possivelmente através de um mecanismo anticolinérgico. Além disso, a PLS-Gi foi eficaz na diarreia secretora induzida pela TC e ETEC, provavelmente bloqueando a ligação dessas toxinas ao GM1. Em conjunto, esses resultados somados a baixa toxicidade oral aguda fornecem suporte científico para o uso da PLS-Gi na prevenção e/ou tratamento das diarreias.

Figura 23. Diagrama do possível mecanismo de ação da PLS-Gi na diarreia induzida por óleo de rícino, toxina da cólera e toxina produzida pela *Escherichia coli* enteroxigênica.



Seta preta (estimula); seta vermelha (inibe). SGLT1: transportador ativo de glicose dependente do sódio tipo 1; M₃: Receptores muscarínicos do tipo 3; GM1: Receptor monossialogangliosídeo; AMPc: Monofosfato cíclico de adenosina; CFTR: Canal Regulador de Condutância Transmembranar de Fibrose Cística; Toxina TL- EPEC: Toxina Termolábel produzida pela *Escherichia coli* enteroxigênica (EPEC).

Referências

- 1 M. Suleiman, T. Dzenda, C.A. Sani. Antidiarrhoeal activity of the methanol stem-bark extract of *Annona senegalensis* Pers. (Annonaceae). *J Ethnopharmacol.* 116 (2008) 125-30.
- 2 C. Walker, I. Rudan, L. Liu, H. Nair, E. Theodoratou, Z.A. Bhutta, K.L. O'brien, H. Campbell, R.E. Black. Global burden of childhood pneumonia and diarrhoea. *Lancet.* 381 (2013) 1405-1416.
- 3 A. Saeed, H. Abd, G. Sandstrom. Microbial etiology of acute diarrhoea in children under five years of age in Khartoum, Sudan. *Indian J Med Microbiol.* 64 (2015) 432-437.
- 4 O. Chassany, A. Michaux, J.F. Bergmann. Drug-induced diarrhoea. *Drug Saf.* 22 (2000) 53-72.
- 5 S. Jin-soon, H. Won-ho, C. Byoung-Soo. Recent Advances of Oral Rehydration Therapy (ORT). *Electrolyte Blood Press.* 8 (2010) 82-86.
- 6 M.J. Cardoso, R.R. Costa, J.F. Mano. Marine Origin Polysaccharides in Drug Delivery Systems. *Mar Drugs.* 14 (2016) 34.
- 7 T. Barahona, N.P. Chandía, M.V. Encinas, Matsushiro B, Zúniga E.A. Antioxidant capacity of sulfated polysaccharides from seaweeds. A kinetic approach. *Food Hydrocolloid* 25(2011) 529-535.
- 8 A.I.F. Vasquez, C.M.D. Sánchez, N.G. Delgado, A.M.S Alfonso, Y.S. Ortega, H.C. Sánchez. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of methanolic extract from red seaweed *Dichotomaria obtusata*. *Braz. J. Pharm. Sci.* 49 (2013) 65-74.
- 9 M. Ciancia, I. Quintana, A.S. Cerezo. Overview of anticoagulant activity of sulfated polysaccharides from seaweeds in relation to their structures, focusing on those of green seaweeds. *Curr Med Chem.* 17 (2010) 2503-2529.
- 10 N.S. Boopathy, K. Kathiresan. Anticancer drugs from marine flora: An Overview. *J Oncol.* 2010 (2010) 1-18.
- 11 R. Bouhlal, C. Haslin, J.C. Chermann, S. Collic-Jouault, C. Siquin, G. Simon, S. Cerantola, H. Riadi, N. Bourgougnon. Antiviral activities of sulfated polysaccharides isolated from *Sphaerococcus coronopifolius* (Rhodophyta, Gigartinales) and *Boergeseniella thyoides* (Rhodophyta, Ceramiales). *Mar. Drugs.* 9 (2011) 1187-1209.
- 12 R.N.S. Amorim, J.A.G. Rodrigues, M.L. Holanda, A.L.G. Quinderé, R.C.M. De Paula, V.M.M. Melo, N.M.B. Benevides. Antimicrobial effect of a crude sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria ornata*. *Braz Arch Biol Technol.* 55 (2012) 171-181.
- 13 R.O. Silva, G.M.P. Santos, L.A.D. Nicolau, L.T. Lucetti, A.P.M. Santana, L.S. Chaves, F.C.N. Barros, A.L.P. Freitas, M.H.L.P. Souza, J.R. Medeiros. Sulfated-polysaccharide fraction from red algae *Gracilaria caudata* protects mice gut against ethanol-induced damage. *Mar. Drugs.* 9 (2011) 2188-2200.
- 14 D.S. Costa, T.S.L. Araújo, N.A. Sousa, L.K.M. Souza, D.M. Pacífico, F.B.M. Sousa, L.A.D. Nicolau, L.S. Chaves, F.C.N. Barros, A.L.P. Freitas, J.R.V. Medeiros. Sulfated Polysaccharide Isolated from the Seaweed *Gracilaria caudata* Exerts an Antidiarrhoeal Effect in Rodents. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 118 (2016) 440-448.
- 15 N.A. Sousa, F.C. Barros, T.S. Araújo, D.S. Costa, L.K. Souza, F.B. Sousa, A.C. Leódidio, D.M. Pacífico, S. De Araújo, F.F. Bezerra, A.L. Freitas A, J.V. Medeiros.

- The efficacy of a sulphated polysaccharide fraction from *Hypnea musciformis* against diarrhea in rodents. *Int. J. Biol. Macromolec.* 86 (2016) 865-75.
- 16 Melo MR, Feitosa JP, Freitas AL, Paula RC. Isolation and characterization of soluble sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria cornea*. *Carbohydr Polym.* 49 (2002) 491-498.
 - 17 F.C. Barros, D.C. Da Silva, V.G. Sombra, J.S. Maciel, J.P. Feitosa, A.L. Freitas, R.C. De Paula. Structural characterization of polysaccharide obtained from red seaweed *Gracilaria caudata* (J Agardh). *Carbohydr Polym.* 92 (2013) 598-603.
 - 18 V.H. Pomin. Review: An overview about the structure–function relationship of marine sulfated homopolysaccharides with regular chemical structures. *Biopolymers.* 91 (2009) 601-609.
 - 19 E. Marinho-Soriano, E. Bourret. Polysaccharides from the red seaweed *Gracilaria dura* (Gracilariales, Rhodophyta). *Bioresour. Technol.* 96 (2005) 379-382.
 - 20 C.F.D. Gurgel, S. Fredericq, J.N. Norris, Y. Yoneshigue-Valentin. Two new flat species of *Gracilaria* (Gracilariales, Rhodophyta) from Brazil: *G. abyssalis* sp. nov. and *G. brasiliensis* sp. nov. *Phycol.* 47 (2008) 249-264.
 - 21 M.J. Wynne, T. Bradshaw, C.M.S. Carrington. A checklist of the benthic marine algae of Barbados, West Indies. *Bot Mar.* 57 (2014) 167-184.
 - 22 W.R.L. Farias, A.P. Valente, M.S. Pereira, P.A.S. Mourão. Structure and anticoagulant activity of sulfated galactans. Isolation of a unique sulfated galactan from the red algae *Botryocladia occidentalis* and comparison of its anticoagulant action with that of sulfated galactans from invertebrates. *J Bio Chem.* 275 (2000) 29299-29307.
 - 23 M.M Bradford. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248-254.
 - 24 Guide for Care and Use of Laboratory Animals - Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences, National Research Council, Washington, D.C, 1996.
 - 25 F. Awouters, A. Megens, M. Verlinden, J. Schuurkes, C. Niemegeers, P.A. Janssen. Loperamide: survey of studies on mechanism antidiarrheal activity. *Dig. Dis. Sci.* 38 (1993) 977-995.
 - 26 G.D. Di Carlo, N. Mascolo, A.A. Izzo, F. Capasso, G. Autore. Effects of quercetin on the gastrointestinal tract in rats and mice. *Phytother. Res.* 8 (1994) 42-45.
 - 27 A. Robert, J.E. Nezamis, C. Lancaster, A.J. Hanchar, M.S. Klepper. 1976. Enteropooling Assay: a test for diarrhea produced by prostaglandins. *Prostaglandins.* 11 (1976) 809-28.
 - 28 C.O. Bewaji, O.O. Olorunsogo, E.A. Bababunmi. Comparison of the membrane bound (Ca²⁺⁺ Mg²⁺)-ATPase in erythrocyte ghosts from some mammalian species. *Comp Biochem Physiol.* 82 (1985) 117-122.
 - 29 T.C. Morais, S.C. Lopes, K.M. Carvalho, B.R. Arruda, F.T.C Souza, M.T.S. Trevisan, V.S. Rao, F.A. Santos. Mangiferin, a natural xanthone, accelerates gastrointestinal transit in mice involving cholinergic mechanism. *World J Gastroenterol.* 18 (2012) 3207-3214.
 - 30 P.C. Reynell, G.H. Spray. The simultaneous measurement of absorption and transit in the gastrointestinal tract of the rat. *J. Physiol.* 15 (1978) 361-371.
 - 31 L. Tradtrantip, E. KO, A.S. Verkman. Antidiarrheal Efficacy and Cellular Mechanisms of a Thai Herbal Remedy. *PLoS Negl Trop Dis.* 13 (2014) 1-11.

- 32 P. Saha, B. Das, K. Chaudhuri. Role of 6-Gingerol in Reduction of Cholera Toxin Activity in Vitro and in Vivo. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57 (2013) 4373-80.
- 33 J.F. Bisson, S. Hidalgo, P. Rozan, M. Messaoudi. Preventive effects of different probiotic formulations on travelers' diarrhea model in wistar rats: preventive effects of probiotics on TD. *Dig Dis Sci.* 55 (2010) 911-919.
- 34 C. Valgas, S.M. Souza, E.F. Smânia, J.R. Smânia. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Braz J Microbiol.* 38 (2007) 369-80.
- 35 Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 423. Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, 2001.
- 36 Y. Freile-Peigrín, E. Murano. Agars from three species of *Gracilaria* (Rhodophyta) from Yucatán Peninsula. *Bioresour Technol.* 96 (2005) 295-302.
- 37 A.V. Skriptsova, Y.V. Nabivailo. Comparison of three gracilarioids: Growth rate, agar content and quality. *J. Appl. Phycol.* 21 (2009) 443-450.
- 38 C.O. Coura, I.W.F. De Araújo, E.S. Vanderlei, J.A. Rodrigues, A.L. Quinderé, B.P. Fontes et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of sulphated polysaccharides from the red seaweed *Gracilaria cornea*. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 110 (2012) 335-341.
- 39 J.G. Carneiro, J.A. Rodrigues, O.V. Sousa, R.B. Souza, A.L. Quinderé, C.O. Coura et al. Peripheral Antinociception and Anti-Inflammatory Effects of Sulphated Polysaccharides from the Alga *Caulerpa Mexicana*. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 115 (2014) 335-342.
- 40 D. Christiaen, M. Bodard. Infrared spectroscopy of agar films from *Gracilaria verrucosa* (Huds.) Papenfuss. *Bot Mar.* 26 (1983) 425-427.
- 41 J.S. Maciel, L.S. Chaves, B.W.S Souza, D.I.A. Teixeira, A.L.P. Freitas, J.P.A. Feitosa, R.C.M. De Paula. Structural characterization of cold extracted fraction of soluble sulfated polysaccharide from red seaweed *Gracilaria birdiae*. *Carbohydr Polym.* 71 (2008) 559-565.
- 42 J.C. Mollet, A. Rahaoui, Y. Lemoine. Yield, chemical composition and gel strength of agarocolloids of *Gracilaria gracilis*, *Gracilariopsis longissima* and the newly reported *Gracilaria cf. vermiculophylla* from Roscoff (Brittany, France). *J Appl Phycol.* 10 (1998) 59-66.
- 43 Rochas C, M. Lahaye, W. Yaphe. Sulfate content of carrageenan and agar determined by infrared-spectroscopy. *Bot Mar.* 29 (1986) 335-340.
- 44 J. Prado-Fernández, J.A. Rodríguez-Vázquez, E. Tojo, J.M. Andrade. Quantitation of κ -, ι -and λ -carrageenans by mid-infrared spectroscopy and PLS regression. *Anal. Chim. Acta.* 480 (2003) 23-37.
- 45 S. Mazumder, P.K. Ghosal, C.A. Pujol, M.J. Carlucci, E.B. Damonte, B. Ray. Isolation, chemical investigation and antiviral activity of polysaccharides from *Gracilaria corticata* (Gracilariaceae, Rhodophyta). *Int J Biol Macromol.* 31 (2002) 87-95.
- 46 S. Sasidharan, I. Darah, M.K. Noordin. In vitro antimicrobial activity against *Pseudomonas aeruginosa* and acute oral toxicity of marine algae *Gracilaria changii*. *New Biotechnol.* 27 (2010) 390-396.
- 47 W.T. Tadesse, A.E. Hailu, A.E. Gurmu, A.F. Mechesso. Experimental assessment of antidiarrheal and antisecretory activity of 80% methanolic leaf extract of *Zehneria scabra* in mice. *BMC Complement Altern Med.* 14 (2014) 460.

- 48 S.P. Gutiérrez, D. Zavala Mendoza, C. Soto Peredo, O. Sánchez Sánchez, M.A. Zavala Sánchez. Evaluation of the anti-diarrheal activity of *Salvia connivens*. *Pharm Biol.* 52 (2014) 1467-1470.
- 49 N.F. Pierce, C.C.J Carpenter Jr, H.L. Elliott, W.B. Greenough. Effect of prostaglandin, theophylline and cholera exotoxin upon transmucosal water and electrolyte movement in canine jejunum. *Gastroenterology.* 60 (1971) 22-32.
- 50 J. Galvez, M.E. Zarzuelo, M.D. Crespo, M. Lorente, A. Ocete, J. Jiménez. Antidiarrhoeal activity of *Euphorbia hirta* extract and isolation of an active flavonoid constituent. *Planta Med.* 59 (1993) 333-336.
- 51 F. Capasso, N. Mascolo, G. Autore, V. Romano. Laxatives and the production of autacoids by rat colon. *J. Pharm. Pharmacol.* 38 (1986) 627-9.
- 52 A. Pinto, G. Autore, N. Mascolo, R. Sorrentino, A. Biondi, A.A. Izzo et al. Time course of PAF formation by gastrointestinal tissue in rats after castor oil challenge. *J. Pharm. Pharmacol.* 44 (1992) 224-226.
- 53 N. Mascolo, T.S. Gaginella, A.A. Izzo et al. Nitric oxide involvement in sodium choleate-induced fluid secretion and diarrhoea in rats. *Eur J Pharmacol.* 264 (1994) 21-26.
- 54 B. Simon, H. Kather. Interaction of laxatives with enzymes of cyclic AMP metabolism from human colonic mucosa. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 10 (1980) 231-234.
- 55 N. Mascolo, A.A. Izzo, F. Barbato, F. Capasso. Inhibitors of nitric oxide synthetase prevent castor-oil-induced diarrhoea in the rat. *Br J Pharmacol.* 108 (1993) 861-864.
- 56 C.L.E. Niemegeers, F.M. Lenaerts, P.A.J. Janseen. Loperamide (R 18 553) a novel type of antidiarrheal agents. Part 2: In vivo oral parenteral pharmacology and acute toxicity in mice. Comparison with morphine, codeine, diphenoxylate. *Arzneimittelforschung.* 24 (1974) 1636-1641.
- 57 I.M. Couper. Opioid action on the intestine, the importance of the intestinal mucosa. *Life Sci J.* 41 (1987) 917-925.
- 58 H. Fischer, T. Machen, J. Widdicombe, T. Carlson, S. Kings. J. Chowk, B. Klller. A novel extract SB-300 from the stem bark latex of *Croton lechleri* inhibits CFTR-mediated chloride secretion in human colonic epithelial cells. *J Ethnopharmacol.* 93 (2004) 351-357.
- 59 D. Rachmilewitz, F. Karmeli, P. Sharon. Decreased colonic Na-K-ATPase activity in active ulcerative colitis. *Isr. J. Med. Sci.* 20 (1984) 681-684.
- 60 T.S. Gaginella, P. Bass. Laxatives: an update on mechanism of action. *Life Sci J.* 23 (1978) 1001-1010.
- 61 F. Christophe. Role of Antidiarrhoeal Drugs as Adjunctive Therapies for Acute Diarrhoea in Children. *Int J Pediatr.* 2013 (2013) 1-14.
- 62 L Liu, A.R. Rittenhouse. Pharmacological discrimination between muscarinic receptor signal transduction cascades with bethanechol chloride. *Br J Pharmacol.* 138 (2003) 1259-1270.
- 63 A.P. Chambers, E.P. Smith, D.P. Begg, B.E. Grayson, S. Sisley, T. Greer, J. Sorrell, L. Lemmen, K. Lasance, S.C. Woods, R.J. Seeley, D.A. D'alessio, D.A. Sandoval. Regulation of gastric emptying rate and its role in nutrient-induced GLP-1 secretion in rats after vertical sleeve gastrectomy. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 15 (2013) 424-432.
- 64 J.V.R. Medeiros, V.H. Bezerra, L.T. Lucetti, R.C.P Lima-júnior, A.L.R. Barbosa, B.M. Tavares, P.J.C. Magalhães, A.A. Santos, F.Q. Cunha, P.M.G. Soares, M.H.L.P. Souza. Role of KATP channels and TRPV1 receptors in hydrogen sulfide-enhanced

- gastric emptying of liquid in awake mice. *European Journal of Pharmacology* 2012; **15**: 57-63.
- 65 K.J. Baldauf, J.M. Royal, K.T. Hamorsky, N. Matoba. Cholera Toxin B: One Subunit with Many Pharmaceutical Applications. *Toxins (Basel)*. 7 (2015) 974-996.
- 66 M. Field. Intestinal secretion: effect of cyclic AMP and its role in cholera. *N Engl J Med*. 284 (1971) 1137-1144.
- 67 Y. Oka, L.R. Saraiva, Y.Y. Kwan, S.I. Korsching. The fifth class of Galpha proteins. *Proc Natl Acad Sci*. 106 (2009) 1484-1489.
- 68 V.I. Mathan. Diarrhoeal diseases. *Br Med Bull*. 54 (1998) 407-419.
- 69 T.S. Araújo, D.S. Costa, N.A. Sousa, L.K. Souza, S. Araújo, A.P. Oliveira, F.B. Sousa, D.A. Silva, A.L. Barbosa, J.R. Leite, J.V. Medeiros. Antidiarrheal activity of cashew GUM, a complex heteropolysaccharide extracted from exudate of *Anacardium occidentale* L. in rodents. *J. Ethnopharmacol*. 4 (2015) 299-307.
- 70 P.M. Becker, H.C. Widjaja-greefkes, P.G. Van Wikselaar. Inhibition of binding of the AB5-type enterotoxins LT-I and cholera toxin to ganglioside GM1 by galactose-rich dietary components. *Foodborne Pathog Dis*. 7 (2010) 225-33.
- 71 W. Minke, C. Roach, W. Hol, C. Verlinde. Structure-Based Exploration of the Ganglioside GM1 Binding Sites of *Escherichia coli* Heat-Labile Enterotoxin and Cholera Toxin for the Discovery of Receptor Antagonists. *Biochemistry*. 38 (1999) 5684-5692.
- 72 C.A. Menezes, J. Amianti, H.S. Harayama, P.C. Koga, L.R. Trabulsi, R.M. Piazza. Inhibition of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin by neoglycoprotein and anti-lectin antibodies which mimic GM1 receptor. *FEMS Microbiol. Lett*. 29 (2002) 67-70.
- 73 D.D. Mitchell, J.C. Pickens, K. Korotkov, E. Fan, W.G. Hol. 3,5-Substituted phenyl glycosides as leads in designing effective cholera toxin antagonists; synthesis and crystallographic studies. *Bioorg. Med. Chem*. 12 (2004) 907-920.
- 74 E.S.O. Vanderlei, I.W.F. Araújo, A.L. Quinderá, P.B. Fontes, Y.R.G. Eloy, J.A.G. Rodrigues et al. The involvement of the HO-1 pathway in the anti-inflammatory action of a sulfated polysaccharide isolated from the red seaweed *Gracilaria birdiae*. *Inflamm Res*. 60 (2011) 1121-1130.
- 75 T.K. Sixma, S.E. Pronk, K.H. Kalk, B.A. Van Zanten, A.M. Berghuis, Hol WG. Lactose binding to heat-labile enterotoxin revealed by X-ray crystallography. *Nat*. 355 (1992) 561-564.
- 76 J.D. Dubreuil. Antibacterial and Antidiarrheal Activities of Plant Products against Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Toxins*. 5 (2013) 2009-2041.
- 77 R. Verhelst, M. Schroyen, N. Buys, T. Niewold. Selection of *Escherichia coli* heat-labile toxin (LT) inhibitors using both the GM1-ELISA and the cAMP Vero cell assay. *Foodborne Pathog Dis*. 10 (2013) 603-607.
- 78 E. Rousset, J. Harel, J.D. Dubreuil. Sulfatide from the pig jejunum brush border epithelial cell surface is involved in binding of *Escherichia coli* enterotoxin b. *Infect. Immun*. 66 (1998) 5650-5658.
- 79 C. Gonçalves, F. Berthiaume, M. Mourez, J.D. Dubreuil. *Escherichia coli* STb toxin binding to sulfatide and its inhibition by carrageenan. *FEMS Microbiol. Lett*. 281 (2008) 30-35.
- 80 S.H. Knutsen, D.E. Myslabodski, B. Larsen, A.I. Usov. A modified system of nomenclature for red algal galactans. *Bot Mar*. 37 (1994) 163-170.
- 81 R.J. Fonseca, S.N. Oliveira, F.R. Melo, M.G. Pereira, N.M. Benevides, P.A. Mourão. Slight differences in sulfation of algal galactans account for differences in their

- anticoagulant and venous antithrombotic activities. *J Thromb Haemost.* 99 (2008) 539-545.
- 82 W. Huang, A. Matte, Y. Li, Y.S. Kim, J.J. Linhardt, H Su et al. Crystal structure of chondroitinase B from *Flavobacterium heparinum* and its complex with a disaccharide product at 1.7 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 294 (1999) 1257-1269.
- 83 W. Eggleston, K.H. Clark, J.M. Marraffa. Loperamide Abuse Associated With Cardiac Dysrhythmia and Death. *Ann Emerg Med.* 67 (2016) 11-14.
- 84 I.W. De Araújo, E.S. Vanderlei, J.A. Rodrigues, C.O. Coura, A.L. Quinderé, B.P. Fontes, I.N. Queiroz et al. Effects of a sulfated polysaccharide isolated from the red seaweed *Solieria filiformis* on models of nociception and inflammation. *Carbohydr. Polym.* 86 (2011) 1207-1215.
- 85 R. Shah, S. Parmar, P. Bhatt, S. Chandra. Evaluation of hepatoprotective activity of thyl acetate fraction of *Tephrosia purpurea*. *Pharmacologyonline.* 3 (2011) 188-194.
- 86 W. Obidah, U.A. Saad, U.A. Wurochekke. Toxic effects of aqueous stem bark extract of *Cassia sieberiana* on some biochemical parameters in rats. *Afr. J. Biochem. Res.* 3 (2009) 229-231.
- 87 C.O. Coura, I.W. De Araújo, E.S. Vanderlei, J.A. Rodrigues, A.L. Quinderé, B.P. Fontes, I.N. De Queiroz, D.B. De Menezes, M.M. Bezerra, A.A. Silva, H.V. Chaves, R.J. Jorge, J.S. Evangelista, N.M. Benevides. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of sulphated polysaccharides from the red seaweed *Gracilaria cornea*. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 110 (2011) 335-341.

5. CONCLUSÃO

- A PLS-Gi apresentou bom rendimento e elevado grau de pureza após a extração. O espectro da PLS-Gi revelou bandas atribuídas ao esqueleto de galactana e a sulfatação no C-6 dos resíduos de L-galactose.
- A PLS-Gi demonstrou atividade antidiarreica no modelo de diarreia e *enteropooling* induzido por óleo de rícino, e aumentou a atividade da Na^+/K^+ - ATPase gastrointestinal.
- A atividade antidiarreica da PLS-Gi é decorrente de sua ação sobre o trânsito gastrointestinal, a partir do bloqueio de receptores colinérgicos.
- A PLS-Gi não interferiu no esvaziamento gástrico, sugerindo que o efeito inibitório sobre a motilidade gastrointestinal ocorre apenas em nível de intestino.
- A PLS-Gi demonstrou efeito antissecretor no modelo de diarreia induzida pela TC, inibindo a perda de água e de íons cloreto a partir dos enterócitos para o lúmen intestinal.
- A PLS-Gi não apresentou efeito no processo normal de absorção intestinal.
- Por meio do ensaio de ELISA foi demonstrado que a PLS-Gi tem a capacidade de interagir com receptores GM1 e também com a TC, evitando a ligação da TC com os receptores GM1.
- No modelo de diarreia induzida pela ETEC, a PLS-Gi reduziu a diarreia e preveniu a perda de peso dos animais.
- A PLS-Gi nas concentrações de 10 e 30 mg/mL não exerce atividade frente a *E.coli*.
- A administração oral da PLS-Gi apresentou baixo potencial de toxicidade aguda, podendo ser enquadrada na Classe 5 segundo o GHS.

Anexos

ANEXO I. DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO DE PROJETO PELA COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL (CEPA).



Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 11/2013, sobre o projeto intitulado: **“POLISSACARÍDEOS DE ORIGEM VEGETAL COM POTENCIAL TERAPÊUTICO SOBRE A DIARREIA AGUDA PROVOCADA POR AGENTES QUÍMICOS E TOXINAS BACTERIANAS”**, de responsabilidade de Jand-Venes Rolim Medeiros e está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA – em reunião realizada em 24 de julho de 2013.

Fortaleza, 24 de julho de 2013


Prof. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA

Prof. Dra. Nylane M. Nunes de Alencar
Coordenadora da CEPA/DIT/FAMED/UFCE
MAT. SIAPE 2106369

ANEXO II. ARTIGO PUBLICADO NA INTERNET DO JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES

International Journal of Biological Macromolecules 97 (2017) 34–45



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijbiomac



Anti-diarrhoeal therapeutic potential and safety assessment of sulphated polysaccharide fraction from *Gracilaria intermedia* seaweed in mice



Ana Carolina M. Leódidio^a, Luis E.C. Costa^b, Thiago S.L. Araújo^a, Douglas S. Costa^a,
Nayara A. Sousa^a, Luan K.M. Souza^a, Francisca B.M. Sousa^c, Manoel D.S. Filho^a,
Daniel F.P. Vasconcelos^d, Felipe R.P. Silva^d, Kerolayne M. Nogueira^c, Alyne R. Araújo^a,
Francisco Clark N. Barros^{b,e}, Ana Lúcia P. Freitas^b, Jand Venes R. Medeiros^{a,c,d,*}

^a The Northeast Biotechnology Network (RENORBIO), Federal University of Piauí, Teresina, PI 64049-550, Brazil

^b Laboratory of Proteins and Carbohydrates of Marine Algae, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE 60455-760, Brazil

^c Biotechnology and Biodiversity Center Research, BIOTEC, Federal University of Piauí – CMRV, Parnaíba, PI 64202-020, Brazil

^d Post-graduation Program in Biomedical Sciences, Federal University of Piauí, Parnaíba, PI 64202-020, Brazil

^e Federal Institute of Education, Science and Technology of Ceará, Juazeiro do Norte, Ceará 63040-540, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 September 2016

Received in revised form 8 December 2016

Accepted 2 January 2017

Available online 5 January 2017

Keywords:

Sulphated macromolecules

Acute diarrhoea

Cholera

Escherichia coli

Toxicology

ABSTRACT

Sulphated polysaccharides extracted from algae have been extensively studied for their diverse biological activities. Thus, the purpose of this study was to evaluate the chemical composition, the anti-diarrhoea effect and acute toxicity of a sulphated polysaccharide fraction obtained from *Gracilaria intermedia* (SP-Gi). Initially, the FT-IR of SP-Gi revealed to be an agaran with sulphation at C-6 of the L-galactosyl residues. The anti-diarrhoeal activity of SP-Gi was evaluated in a castor oil-induced diarrhoea model. The effects of SP-Gi on enteropooling, Na⁺-K⁺-ATPase activity, gastrointestinal transit, and gastric emptying were then examined. Subsequently, the effect of SP-Gi on diarrhoea induced by cholera toxin (CT) and *Escherichia coli* was examined. In addition, an acute toxicity test was conducted in accordance with OECD guideline 423. Pre-treatment with SP-Gi reduces the total faeces, total diarrhoeal faeces, and enteropooling. SP-G (30 mg/kg *p.o.*) increased Na⁺/K⁺-ATPase activity and reduced gastrointestinal transit through anticholinergic mechanisms. ELISA demonstrated that SP-Gi can interact with GM1 receptors and CT. SP-Gi reduced diarrhoea induced by *E. coli* and prevented weight loss in the animals. Moreover, SP-Gi did not induce any toxicity signs. These results suggest that SP-Gi is a possible candidate for the treatment of diarrhoea illnesses.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Diarrhoea is a gastrointestinal disorder characterised by increased frequency of defaecation (three or more times per day), more fluidity of faeces, and/or the presence of blood and mucous, which can lead to electrolyte imbalance [1]. Despite improvements in public health and reduced mortality from diarrhoea in recent years, this disease continues to be one of leading causes of death among children less than five years of age worldwide [2].

In developing countries, infectious diseases, including enterotoxin-producing bacteria (*Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*), enteroinvasive bacteria (*Shigella* and *Salmonella*) parasites (*Entamoeba histolytica* and *Cryptosporidium parvum*), and viruses (Rotavirus) are the major causes of diarrhoea [3]. Moreover other factors may be responsible for diarrhoea, including drugs anxiety, infectious agents and toxins, among others [4].

Oral rehydration solutions (ORS) are the first line of treatment for diarrhoea worldwide. However, ORS currently available are unable to reduce the duration and severity of diarrhoea [5]. Therefore, the growing demand for molecules with therapeutic potential has led to increased interest in research involving organisms of marine origin, due to their great biodiversity [6]. Of these molecules, the sulphated polysaccharides obtained from

* Corresponding author at: Av. São Sebastião, 2819, 64202-020, Parnaíba, PI, Brazil.
E-mail address: jandvenes@ufpi.edu.br (J.V.R. Medeiros).

Apêndices

APÊNDICE A. PARÂMETROS AVALIADOS NO ENSAIO DE TOXICIDADE ORAL AGUDA (ADAPTADO DE BRITO, 1994).

PARÂMETROS	SINAIS DE TOXICIDADE	ESCORES
ATIVIDADE GERAL	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GERAL DO ANIMAL NA GAIOLA APÓS ESTÍMULO	0 – NÃO SE MOVE 1- DÁ UM PASSO 2- MEIA-VOLTA NA GAIOLA 3- DUAS VOLTAS NA CAIXA OU MOVIMENTO DE ALERTA (PADRÃO) 4- ANDA COM AGILIDADE
SISTEMA SENSORIAL		
IRRITABILIDADE	RESPOSTA DO ANIMAL APÓS TOQUE OU SOPRO NA FACE	0 – AUSENTE 1 – PRESENTE
REFLEXO PALPEBRAL	REFLEXO DOS OLHOS APÓS APROXIMAÇÃO LENTA DE UMA PINÇA, MAS SEM O TOQUE	0 - OLHOS FICAM ABERTOS 1 - QUASE NÃO SE MOVEM 2 - MOVEM-SE POUCO E LENTAMENTE 3 - FECHAM PELA METADE QUANDO A PINÇA SE APROXIMA 4 - FECHAM TOTALMENTE QUANDO A PINÇA SE APROXIMA (PADRÃO)
REFLEXO AURICULAR	POSIÇÃO DA ORELHA APÓS VÁRIOS ESTALOS CONSECUTIVOS, QUANTO MAIS PRÓXIMA DA CABEÇA MENOR SERÁ O REFLEXO.	0 - AUSENTE, ORELHA COLADA À CABEÇA 1 - ORELHA LIGEIRAMENTE COLADA NA CABEÇA 2 - ORELHA EM PÉ PELA METADE 3 - ORELHA EM POSIÇÃO USUAL 4 - ORELHA TOTALMENTE EM PÉ
APERTO DA CAUDA	RESPOSTA AO APERTO INTENSO DA EXTREMIDADE DA CAUDA COM UMA PINÇA	0 – NÃO SE MOVE 1 – MOVE-SE LENTAMENTE 2 – MOVE-SE RAPIDAMENTE 3 – MOVE-SE E PULA (PADRÃO) 4 – MOVE-SE, PULA E CORRE
SISTEMA PSICOMOTOR		
REFLEXO DE ENDIREITAMENTO	RESPOSTA DO ANIMAL PARA VOLTAR A POSIÇÃO NORMAL QUANDO É COLOCADO COM O DORSO SOBRE UMA SUPERFÍCIE (MÁXIMO 15 SEG)	0 – NÃO SE MOVE 1-VOLTA LENTAMENTE E COM DIFICULDADE 2- VOLTA LENTAMENTE 3-VOLTA RÁPIDO 4-VOLTA IMEDIATAMENTE E COM AGILIDADE (PADRÃO)

CONTINUAÇÃO - APÊNDICE C. PARÂMETROS AVALIADOS NO ENSAIO DE TOXICIDADE ORAL AGUDA (ADAPTADO DE BRITO, 1994)

PARÂMETROS	SINAIS DE TOXICIDADE	ESCORES
FORÇA PARA AGARRAR	INTENSIDADE COM QUE O ANIMAL SE AGARRA A UMA GRADE QUANDO ESTA TEM SUA POSIÇÃO LEVEMENTE MODIFICADA	0 – NÃO SE AGARRA 1-SE AGARRA, MAS EM SEGUIDA LARGA A GRADE 2-SEGURA POR UM TEMPO, MAS CAI 3-SEGURA FIRMEMENTE, MAS NÃO SUPORTA E CAI 4-SEGURA FIRMEMENTE E NÃO CAI (PADRÃO)
ATAXIA	MOVIMENTOS DESORDENADOS DEVIDO A OSCILAÇÕES ENTRE ESTADOS DE CONSCIÊNCIA E INCONSCIÊNCIA	0 - AUSENTE (PADRÃO) 1 – PRESENTE
CONTORÇÃO	MOVIMENTO VERMIFORME DO CORPO	0 - AUSENTE (PADRÃO) 1 – PRESENTE
	SISTEMA NERVOSO CENTRAL	
ANESTESIA	AUSÊNCIA DE RESPOSTA AO ESTÍMULO DOLOROSO COM PERDA DO REFLEXO DE ENDIREITAMENTO	0 - AUSENTE (PADRÃO) 1- PRESENTE
TREMORES	OBSERVAR PRESENÇA OU NÃO	0 - AUSENTE (PADRÃO) 1- PRESENTE
CONVULSÃO	OBSERVAR PRESENÇA OU NÃO	0 - AUSENTE (PADRÃO) 1- PRESENTE
	SISTEMA NERVOSO AUTÔNOMO	
PILOEREÇÃO	EREÇÃO DOS PELOS DO CORPO	0 - AUSENTE (PADRÃO) 1 - EREÇÃO LEVE 2 - GRAU LIGEIRAMENTE MAIOR QUE O ANTERIOR 3 - VISÍVEL, MAS NÃO TOTALMENTE ERETO 4 - TOTALMENTE ERETO
PTOSE PALPEBRAL	PÁLPEBRAS FECHADAS OU SEMIFECHADAS MESMO APÓS O ESTÍMULO	0 - AUSENTE (PADRÃO) 1 - LIGEIRAMENTE FECHADO 2 - SEMIFECHADO 3 - QUASE TOTALMENTE FECHADO 4 - FECHADO
CIANOSE	PONTOS COM COLORAÇÃO ANORMAL NO CORPO, SOBRETUDO NOS PÉS	0 - AUSENTE (PADRÃO) 1- COR ESBRANQUIÇADA 2 - COR LEVEMENTE AZULADA 3 - COR LEVEMENTE ARROXEADA 4 - COR TOTALMENTE ARROXEADA
DEFECAÇÃO	NÚMERO DE BOLOS FECAIS	NÚMERO DE PELLETS DE EXCRETAS
LACRIMAÇÃO	PRESENÇA OU AUSÊNCIA	0 - AUSENTE (PADRÃO) 1- PRESENTE
MORTE		

APÊNDICE B. PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS DE CAMUNDONGOS APÓS A ADMINISTRAÇÃO DA PLS-Gi (2.000 mg/kg, v.o.) .

PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS	CONTROLE	PLS-Gi (2.000 mg/kg, v.o.)
HEMÁCIAS ($1 \times 10^6 / \mu\text{L}$)	7±0,28	7±0,06
HEMATÓCRITO (%)	36,75±0,95	36,50±0,57
HEMOGLOBINA (g/dL)	11,88±0,75	11,66±0,80
VCM (fL)	51,08±0,71	51,72±0,36
HCM (pg)	16,35±0,45	16,51±1,00
CHCM (g/dL)	32,01±0,52	31,92±1,72
LEUCÓCITOS ($1 \times 10^3 / \mu\text{L}$)	4±0,25	5±0,30
PLAQUETAS ($1 \times 10^3 / \mu\text{L}$)	500±16,33	505±19,15

Os valores estão expressos como média ± EPM. ANOVA e Teste Turkey. Volume corpuscular média (VCM), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM), Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM).

APÊNDICE C. PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DE CAMUNDONGOS APÓS A ADMINISTRAÇÃO DA PLS-Gi (2.000 mg/kg, v.o.).

PARÂMETROS	CONTROLE	PLS-Gi (2.000 mg/kg, v.o.)
GLICOSE (mg/dL)	101,5±5,6	103,4±6,0
TRIGLICERÍDEOS (mg/dL)	89,0±3,0	85,98±1,9
COLESTEROL TOTAL (mg/dL)	104,7±5,4	96,0±6,7
URÉIA (mg/dL)	38,97±0,35	39,56±3,01
TRANSAMINASE GLUTÂMICO OXALACÉTICA (U/L)	56,50±4,95	60,5±7,77
TRANSAMINASE GLUTÂMICO PIRUVICA (U/L)	76,5±6,36	82±4,24
BILIRRUBINA DIRETA (mg/dL)	6,2±2,0	6,8±2,6
PROTEÍNA TOTAL (g/dL)	6,3±0,8	6,6±0,9

Valores apresentados em média±erro padrão da média, n=6 animais por grupo.

