



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

NAYARA ALVES DE SOUSA

**EFICÁCIA DO POLISSACARÍDEO SULFATADO EXTRAÍDO DA ALGA
MARINHA VERMELHA *Hypnea musciformis* CONTRA DIARREIA EM ROEDORES**

PARNAÍBA-PIAUÍ

2016

NAYARA ALVES DE SOUSA

**EFICÁCIA DO POLISSACARÍDEO SULFATADO EXTRAÍDO DA ALGA
MARINHA VERMELHA *Hypnea musciformis* CONTRA DIARREIA EM ROEDORES**

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

Linha de Pesquisa: Farmacologia Molecular Aplicada à Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Jand Venes Rolim Medeiros.

PARNAÍBA – PIAUÍ

2016

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

S725e Sousa, Nayara Alves de.
Eficácia do polissacarídeo sulfatado extraído da alga marinha vermelha
Hypnea musciformis contra diarreia em roedores [manuscrito] / Nayara
Alves de Sousa. – 2016.
127 f. : il. color.

Impresso por computador (printout).
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do
Piauí, 2016.
Orientação: Prof. Dr. Jand Venes Rolim Medeiros.

1. *Hypnea Musciformis* (Alga Vermelha). 2. Alga Marinha Vermelha.
3. Polissacarídeo Sulfatado. 4. Diarreia - Doenças Gastrointestinais. I.
Titulo.

CDD: 660.6

NAYARA ALVES DE SOUSA

EFICÁCIA DO POLISSACARÍDEO SULFATADO EXTRAÍDO DA ALGA MARINHA
VERMELHA *Hypnea musciformis* CONTRA DIARREIA EM ROEDORES

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

Aprovada em: ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Jand Venes Rolim Medeiros

Universidade Federal do Piauí - UFPI (Orientador)

Prof. Dr. Gilberto Santos Cerqueira

Universidade Federal do Piauí - UFPI

Prof. Dr. Marcelo de Carvalho Filgueiras

Universidade Federal do Piauí - UFPI

Dedico,

Aos meus pais, Espírito Santo e Roseno Alves,
com muito amor.

Descobri como é bom chegar quando se tem paciência e para se chegar onde quer que seja,
aprendi que não é preciso dominar a força, mas a razão.

É preciso antes de mais nada, Querer.

Um dia é preciso parar de sonhar, tirar os planos das gavetas e, de algum modo, partir...

(Amyr Klink)

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal do Piauí pela oportunidade vivenciada.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jand Venes Rolim Medeiros, pela oportunidade de aprendizado, confiança e orientação, contribuindo imensamente para o meu crescimento profissional. Por você tenho a mais sincera admiração e um profundo respeito. Serei sempre grata pelas orientações criteriosas.

À banca examinadora composta pelo Prof. Dr. Gilberto Santos Cerqueira e Prof. Dr. Marcelo de Carvalho Filgueiras pelas valiosas contribuições.

À Profa. Dra. Ana Lúcia Pontes Freitas e toda equipe do Laboratório de Algas Marinhas I do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará pela imensa contribuição com os polissacarídeos sulfatados fornecidos na realização da pesquisa.

Aos professores do Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia pela exímia dedicação à docência.

Ao Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais (NPPM) da UFPI por disponibilizar os animais necessários a realização dessa pesquisa.

A toda a família do laboratório de Físio-Farmacologia Experimental (LAFEX): Beatriz Melo, Nathália Carvalho, José Júnior, Dvison Pacífico, Irismara Silva, Elenice Alvarenga, Ana Leódido, Fabiana Moura, Simone de Araújo, Patrícia Oliveira, Monique Soares, Kerolayne Nogueira, Bruno Iles, Gabriela Pacheco, Matheus Sombra, Carol Brandão e Vanessa Meneses, pela ajuda concedida na execução dos trabalhos, convívio, amizade, incentivo e por serem pessoas especiais. Muito obrigada pela disposição e dedicação às horas de experimento, pela harmonia do ambiente de trabalho e por todos os momentos felizes compartilhados juntos.

Aos meus escudeiros: Douglas Soares, Thiago Lopes e Luan Kelves, que se tornaram não somente colegas de trabalhos, mas sim, verdadeiros amigos.

Aos colegas do Curso de Mestrado em Biotecnologia pelo enriquecimento da experiência da pós-graduação, bem como pelo aprendizado científico.

À Karliane Uchôa por disponibilizar os dados epidemiológicos oriundos do Sistema Informatizado de Vigilância Epidemiológica/Monitorização das Doenças Diarreicas Agudas (SIVEP/MDDA) referentes a cidade de Parnaíba.

Ao Cleisson pela importante atenção na disponibilidade de materiais no laboratório, bem como a solicitude e presteza em nos ajudar sempre que necessário.

Ao CNPq e a FAPEPI pelo auxílio financeiro sob a forma de concessão de bolsa de mestrado.

A minha família que sempre torceu pelo meu sucesso. Em especial aos meus pais, Espírito Santo e Roseno Alves, pelo amor, carinho e cuidados que recebi durante toda vida e pelo grande esforço com minha educação. Essa conquista é nossa!

Ao meu namorado, Silva Neto, pelo incentivo e amor nos momentos mais difíceis e, principalmente, por compartilhar das minhas lágrimas e sorrisos.

Acima de tudo, agradeço a Deus pela saúde, fortaleza, perseverança e suporte em todos os momentos da minha vida.

E a todos que contribuíram para a realização do presente trabalho e que não foram citados, peço que recebam meu eterno reconhecimento e apreço.

RESUMO

As algas marinhas são fonte de diversos compostos biologicamente ativos com potencial ação terapêutica, como os polissacarídeos sulfatados (PLS), os quais são reconhecidos por apresentarem um grande número de atividades biológicas, incluindo ação moduladora gastrointestinal. Considerando que a diarreia é a manifestação clínica mais frequente relacionada com doenças gastrointestinais e que atualmente não existe um tratamento específico destinado a esse problema clínico, o objetivo do presente estudo foi avaliar a eficácia antidiarreica do PLS extraído na alga marinha vermelha *H. musciformis*, bem como avaliar os possíveis mecanismos envolvidos neste efeito. Os procedimentos e protocolos experimentais utilizados nesse estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará (Protocolo nº 11/2013). Inicialmente, o efeito antidiarreico do PLS foi avaliado no modelo de diarreia aguda e *enteropooling* induzido por óleo de rícino. Dessa forma, ratos wistar (150-180 g) foram pré-tratados com salina (2,5 ml/kg, *v. o.*), ou loperamida (5 mg/kg, *v. o.*), ou PLS (10, 30 e 90 mg/kg, *v. o.*). Uma hora depois os ratos receberam óleo de rícino (10 ml/kg, *v. o.*). Após 3 horas foi avaliada a severidade da diarreia, o número total de fezes, o número total de fezes diarreicas e a medição do volume do conteúdo intestinal (*enteropooling*). Além disso, a partir da indução da diarreia com óleo de rícino, foi avaliada a atividade da proteína Na⁺ K⁺ ATPase presente no intestino delgado de camundongos (swiss; 25-30g) mensurada partir da hidrólise do ATP. Em outros grupos experimentais, com camundongos, foi realizado o teste de motilidade intestinal, utilizando 0,2 ml de carvão (*v. o.*) como marcador da distância percorrida ao longo do intestino. Para verificar um possível envolvimento de mecanismo opióide e/ou colinérgico na atividade do PLS sobre o trânsito intestinal foi utilizado naloxona (2 mg/kg, *s. c.*; antagonista opioide) e betanecol (3 mg/kg, *i. p.*; agonista colinérgico), respectivamente. Para o estudo do esvaziamento gástrico, outro grupo experimental (camundongos) foi tratado com PLS (90 mg/kg, *v. o.*) e uma hora depois receberam uma solução glicosada (5%) contendo vermelho de fenol (0,75 mg/ml). Após 20 minutos, os animais foram eutanasiados e o esvaziamento gástrico foi avaliado por técnica de espectrofotometria. O efeito antidiarreico do PLS ainda foi analisado pelo modelo de diarreia inflamatória induzida por prostaglandina E₂ (PGE₂), em ratos. Assim, os animais foram pré-tratados com PLS (90 mg/kg, *v. o.*) e imediatamente após a administração, PGE₂ (100 µg/kg, *v. o.*) foi administrada. Após 30 minutos, os animais foram eutanasiados e o volume do conteúdo intestinal foi mensurado. Foi utilizado o modelo de secreção intestinal induzida pela toxina da cólera (TC) (1 µg/alça) em camundongos para caracterizar a atividade antissecretória do PLS. A seguir, foi determinada a concentração de íons cloreto no fluido intestinal acumulado em cada alça isolada, bem como foi avaliado o efeito do PLS na absorção intestinal. Além disso, a capacidade de ligação do PLS ao receptor monossialogangliosídeo-GM1 foi analisada por meio da técnica de ELISA. O pré-tratamento com todas as doses do PLS (10, 30 e 90 mg/kg) inibiu significativamente (P < 0,05) a diarreia induzida por óleo de rícino, com redução do número total de fezes, número total de fezes diarreicas e severidade da diarreia. A dose de 90 mg/kg reduziu significativamente (P < 0,05) o efeito antidiarreico no *enteropooling* induzido por óleo de rícino, aumentou (P < 0,05) a atividade da proteína Na⁺ K⁺ ATPase no intestino delgado, reduziu (P < 0,01) o trânsito intestinal, possivelmente por meio da ativação de receptores colinérgicos, além de inibir (P < 0,05) o *enteropooling* induzido por PGE₂. Contudo, o PLS não mostrou influência no esvaziamento gástrico. Além disso, a secreção de fluido e os níveis de cloreto presentes no conteúdo intestinal induzidos pela TC, foram reduzidos significativamente (P < 0,001) nos animais pré-tratados com PLS, provavelmente devido a interação com o receptor GM1. Em conclusão, os resultados sugerem que o PLS exerce seu efeito antidiarreico devido a capacidade em aumentar a atividade de Na⁺ K⁺ ATPase no intestino delgado, inibir a

motilidade intestinal associada a uma possível atividade anticolinérgica, bem como bloquear a ligação TC-GM1.

Palavras-chave: Carboidrato, óleo de rícino, prostaglandina E₂, toxina da cólera, GM1.

ABSTRACT

Seaweeds are source of several biologically active compounds with potential therapeutic action, such as sulfated polysaccharides (PLS), which are known to have a variety of biological activities, including gastrointestinal modulatory action. Considering that diarrhea is the most common clinical manifestation related gastrointestinal diseases and currently there is no specific treatment for this medical condition, the objective of this study was to evaluate the effectiveness of anti-diarrheal PLS extracted in red seaweed *H. musciformis* and to assess the possible mechanisms involved in this effect. Experimental procedures and protocols used in this study were approved by the Ethics Committee in Research of the Federal University of Ceará (protocol no. 11/2013). Initially, the antidiarrheal effect of PLS was evaluated in the model of acute diarrhea and enteropooling induced by castor oil. Thus, wistar rats (150-180 g) were pretreated with saline (2,5 ml/kg, *p. o.*), or loperamide (5 mg/kg, *p. o.*), or PLS (10, 30 e 90 mg/kg, *p. o.*). One hour later the rats receive castor oil (10 ml/kg, *p. o.*). After 3 hours was evaluated the severity of the diarrhea, number of feces, total number of diarrheal stools and measuring the volume of intestinal contents (enteropooling). Furthermore, from the induction of diarrhea castor oil, was evaluated the protein activity $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase present in the small intestine of mice (swiss; 25-30g) assayed as a release of inorganic phosphate from the hydrolysis of ATP. In other experimental groups, with mice, was performed intestinal motility test, using 0.2 ml of charcoal (*p. o.*) as marker of distance traveled along the intestine. To verify a possible involvement of mechanism opioid and/or cholinergic in activity of PLS on intestinal transit was used naloxone (2 mg/kg, *s. c.*; opioid antagonist) and bethanechol (3 mg/kg, *i. p.*; cholinergic agonist), respectively. To evaluate gastric emptying, other experimental group (mice) were treated orally with PLS (90 mg/kg) and one hour later received a glucose solution (5%) containing phenol red (0.75 mg/ml). After 20 minutes, the animals were euthanized and gastric emptying was assessed by spectrophotometry technique. The antidiarrheal effect was further analyzed by PLS diarrhea inflammatory model induced by prostaglandin E_2 (PGE_2) in rats. Thus, the animals were pretreated with PLS (90 mg/kg, *p. o.*) and immediately after administration, PGE_2 (100 mg/kg, *p. o.*) was administered. After 30 minutes, the animals were euthanized and intestinal content was measured. We used the intestinal secretion model induced by cholera toxin (CT) (1 $\mu\text{g}/\text{loop}$) in mice to characterize the antisecretory activity of PLS. Next, was determined the concentration of chloride ions in the intestinal fluid accumulated in each closed loop, and was evaluated the effect of PLS in the intestinal absorption. In addition, the binding ability of the PLS to monosialoganglioside-GM1 receptor was analyzed by ELISA. The pre-treatment with all doses of PLS (10, 30 and 90 mg/kg) inhibited significantly ($P < 0.05$) diarrhea induced by castor oil, with reduction of the total number of feces, total number of diarrheal stools and severity of diarrhea. The dose of 90 mg/kg reduced significantly ($P < 0.05$) antidiarrheal effect on enteropooling induced by castor oil, increased ($P < 0.05$) protein activity $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase activity in the small intestine, reduced ($P < 0.01$) intestinal transit, possibly through the activation of cholinergic receptors, and inhibit ($P < 0.05$) the enteropooling induced PGE_2 . However, the PLS no showed effect on gastric emptying. In addition, fluid secretion and chloride levels present in the intestinal contents induced by CT were significantly reduced ($P < 0.001$) in animals pretreated with PLS, probably due to interaction with the GM1 receptor. In conclusion, the results suggest that PLS exerts its antidiarrheal effect due to the ability to increase the activity of $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase activity in the small intestine, inhibit the intestinal motility associated with a potential anticholinergic activity, as well as block CT-GM1 binding.

Keywords: Carbohydrate, castor oil, prostaglandin E_2 , cholera toxin, GM1.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Alga Marinha Vermelha <i>Hypnea musciformis</i>	24
Figura 2.	Esquema do mecanismo de ação da toxina da cólera (TC) nos enterócitos	32
Figura 3.	Escores de diarreia	45
Figura 4.	Efeito do PLS na diarreia induzida por óleo de rícino em ratos	54
Figura 5.	Efeito do PLS na atividade da proteína Na ⁺ K ⁺ ATPase no intestino dos camundongos, na diarreia induzida por óleo de rícino	55
Figura 6.	Naloxona não altera o efeito do PLS no trânsito intestinal em camundongos	56
Figura 7.	O PLS reduz o efeito estimulatório do betanecol no trânsito intestinal em camundongos.	57
Figura 8.	O PLS não acelera o esvaziamento gástrico em camundongos	58
Figura 9.	O PLS inibe a secreção de fluido intestinal induzida pela TC em de alças isoladas	59
Figura 10.	Efeito do PLS na ligação de TC ao receptor GM1	61
Figura 11.	Modelo de atuação sugerido para o PLS na diarreia induzida por óleo de rícino, PGE ₂ e toxina da cólera (TC) em roedores	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Efeito do PLS (10, 30, 90 mg/kg <i>v.o.</i>) na diarreia induzida por óleo de rícino em ratos.....	53
Tabela 2.	Efeito do PLS (10, 30, 90 mg/kg <i>v.o.</i>) no <i>enteropooling</i> induzido por óleo de rícino em ratos.	54
Tabela 3.	Efeito do PLS (90 mg/kg <i>v.o.</i>) no <i>enteropooling</i> induzido por PGE ₂ em ratos	58

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

5-HT	Serotonina
AA	Ácido araquidônico
AC	Adenilato ciclase
ADP	Difosfato de adenosina
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
ANOVA	Análise de variância
ARF	Fatores de ribosilação do ADP
ATP	Trifosfato de adenosina
Atr	Atropina
BSA	Albumina sérica bovina
CFTR	Regulador de condutância transmembrana de fibrose cística
Cl⁻	Íon cloreto
COX	Ciclo-oxigenase
EAEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa
EGTA	Ácido etilenoglicol tetracético
EP3	Receptores 3 de prostaglandina E ₂
EPM	Erro padrão da média
ETEC	<i>Escherichia Coli</i> enterotoxigênica
EPEC	<i>Escherichia Coli</i> enteropatogênica
GM1	Monossialogangliosídeo 1
HCO₃⁻	Bicarbonato
<i>i.p.</i>	Intraperitoneal
K⁺	Íon potássio
KCl	Cloreto de potássio
L-NAME	NG-nitro-L-arginina metil-ester
L-NMMA	NG-monometil-L-arginina
LOP	Loperamida
MgCl₂·6H₂O	Cloreto de magnésio hexahidratado
Na⁺	Íon sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio

NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAF	Fator ativador de plaquetas
PBS	Tampão fosfato-salina
PGE₂	Prostaglandina E ₂
Pi	Fosfato inorgânico
PKA	Proteína quinase A
PLS	Polissacarídeos sulfatados
<i>s.c</i>	Subcutânea
Sal	Salina/ Soro fisiológico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SNC	Sistema nervoso central
SRO	Solução de reidratação oral
VIP	Peptídeo intestinal vasoativo
TC	Toxina da cólera
TMB	3, 30, 5, 50-Tetrametilbenzidina
<i>v.o.</i>	Via oral
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

1. INTRODUÇÃO	17
2. REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1. Produtos Naturais como Fonte de Recurso Terapêutico	19
2.2. Considerações sobre Algas Marinhas	21
2.3. Alga Marinha <i>Hypnea musciformis</i> e Polissacarídeos Sulfatados	23
2.4. Considerações Gerais sobre Diarreia.....	25
2.5. Classificação Clínica da Diarreia	27
2.5.1. Diarreia aguda.....	27
2.5.1.1. Diarreia infecciosa.....	27
2.5.1.2. Diarreia do viajante	28
2.5.2. Diarreia persistente	28
2.5.3. Diarreia crônica	29
2.6. A Cólera.....	29
2.7. Características Epidemiológicas da Diarreia.....	33
2.8. Tratamento das Doenças Diarreicas	34
2.9. Uso do Óleo de Rícino como Agente Laxativo.....	37
3. JUSTIFICATIVA	40
4. OBJETIVOS	41
4.1. Objetivo Geral	41
4.2. Objetivos Específicos	41
5. METODOLOGIA.....	42
5.1. Coleta e Processamento da Alga Marinha <i>Hypnea musciformis</i>	42
5.2. Extração dos Polissacarídeos por Digestão com Papaína (Enzimática).....	42
5.3. Drogas e Reagentes	42

5.4. Animais.....	43
5.5. Avaliação da Eficácia Antidiarreica do Polisacarídeo Sulfatado (PLS) Extraído da Alga Marinha Vermelha <i>Hypnea musciformis</i>	43
5.5.1. Diarreia induzida por óleo de rícino	43
5.5.2. Acúmulo do fluido intestinal	45
5.5.3. Determinação da atividade de Na ⁺ K ⁺ ATPase no intestino delgado.....	46
5.5.4. Avaliação do trânsito intestinal	47
5.5.5. Avaliação do esvaziamento gástrico	48
5.5.6. <i>Enteropooling</i> induzido por PGE ₂	49
5.5.7. Secreção de fluido intestinal induzida pela toxina da cólera em alças intestinais isoladas	50
5.5.8. Determinação da concentração de íons cloreto no fluido intestinal	50
5.5.9. Avaliação da absorção intestinal em alças isoladas.....	51
5.5.10. GM1-ELISA	51
5.5.11. Análise estatística	52
6. RESULTADOS	53
6.1. Efeito do PLS sobre a diarreia induzida por óleo de rícino	53
6.2. O PLS reduz o acúmulo de fluido intestinal (<i>enteropooling</i>) induzido por óleo de rícino	54
6.3. Efeito do PLS sobre a atividade da proteína Na ⁺ K ⁺ ATPase no intestino delgado.....	55
6.4. Participação de mecanismo opioide e colinérgico no efeito do PLS sobre a redução do trânsito intestinal	55
6.5. Efeito do PLS no esvaziamento gástrico	57
6.6. Efeito do PLS sobre o <i>enteropooling</i> intestinal induzido por PGE ₂	58
6.7. Eficácia do PLS na secreção de fluido induzida pela toxina da cólera em alças intestinais isoladas	59
6.8. Efeito do PLS sobre a concentração de íons cloreto na secreção de fluido induzida pela toxina da cólera em alças intestinais isoladas	60
6.9. Eficácia do PLS na absorção intestinal	60
6.10. O PLS interage com o receptor GM1 impedindo a ligação da toxina da cólera	60
7. DISCUSSÃO	62
8. CONCLUSÕES	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
ANEXO	86
APÊNDICE	88

1. INTRODUÇÃO

As algas marinhas são fonte de diversos compostos biologicamente ativos com potencial ação terapêutica. Entre estes compostos estão os polissacarídeos sulfatados (PLS), os quais são os maiores componentes da matriz extracelular de algas marinhas (HAN et al., 2005). Os PLS são polímeros complexos e heterogêneos formados por unidades repetidas de monossacarídeos com presença de radicais sulfato (JIAO et al., 2011). Estes polímeros estão envolvidos em vários processos celulares e são reconhecidos por apresentarem um grande número de atividades biológicas, incluindo ação gastroprotetora (SILVA et al., 2012; SILVA et al., 2011), antioxidante (BARAHONA et al., 2011), anticoagulante (CIANCIA, QUINTANA e CERESO, 2010), antiviral (OHTA et al., 2009), imunoestimulatória (ZHA et al., 2015), antitumoral (SHAO, CHEN e SUN, 2013), anti-inflamatória e anti-nociceptiva (CHAVES et al., 2012). Portanto, essas biomoléculas exibem importantes aplicações e assim tem atraído a atenção de vários grupos de pesquisa para o desenvolvimento de novas drogas.

Os PLS encontrados nas algas vermelhas podem apresentar-se na forma de galactanas sulfatadas, exibindo alta massa molecular (≥ 100 kDa) e alta eletronegatividade (PERCIVAL e MCDOWELL, 1967). Isto pode possibilitar interações eletrostáticas com proteínas específicas, o que possivelmente contribui para as suas ações biológicas observadas (SILVA et al., 2010; USOV, YAROTSKY e SHASHKOV, 1980). Baseado na sua estereoquímica, galactanas sulfatadas podem ser classificadas como ágar ou carragenanas (RECALDE et al., 2016). De particular importância, as carragenanas compartilham uma estrutura básica comum, consistindo de uma cadeia linear com resíduos alternados de ($\rightarrow 3$)- β -D-galactopiranosose e ($\rightarrow 4$)- α -D-galactopiranosose, com uma unidade D ocorrendo muitas vezes como sua forma 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose (YANG et al., 2009). As formas mais comuns de carragenanas são tradicionalmente identificados por símbolos gregos, como por exemplo, kappa (κ), iota (ι), e lambda (λ). Estas são considerados as três formas mais importantes comercialmente (BONDU et al., 2010; CAMPO et al., 2009).

A alga vermelha *Hypnea musciformis* representa uma grande fonte de carragenanas naturais (GREER et al., 1984), o que a torna bastante explorada na costa nordeste do Brasil (ALVES et al., 2012). A estrutura química das carragenanas produzidas por *H. musciformis* tem sido extensivamente descrita na literatura (COZENZA et al., 2014; ARMAN e QADER, 2012; AZIZA et al., 2008) e constitui principalmente de repetições de ($\rightarrow 3$)- β -D-galactose-4-

sulfato conectado a (\rightarrow 4)-3,6-anidro- α -D-galactopiranosose. Assim, este polímero é nomeado de κ -carragenana (VELDE et al., 2002).

O potencial terapêutico do PLS extraído da alga vermelha *H. musciformis* foi recentemente avaliado pelo nosso grupo de pesquisa, em modelos animais, e foi evidenciado que esse composto possui efeito anti-inflamatório (BRITO et al., 2013). Adicionalmente, foi mostrado que o PLS exerceu efeito gastroprotetor em modelo de lesão induzida por etanol (DAMASCENO et al., 2013), evidenciando, dessa maneira, efeito modulador em distúrbios gastrointestinais.

Entre as manifestações clínicas mais frequentes relacionadas com doenças gastrointestinais está a diarreia, a qual é caracterizada por um aumento no número de evacuações, três ou mais vezes por dia, com uma mudança na consistência das fezes acompanhada de dor abdominal (XU et al., 2013). A diarreia é responsável por cerca de milhões de mortes anualmente, principalmente entre crianças menores de 5 anos de idade (RAHMAN et al., 2013). Desde os tempos antigos, essa doença tem sido reconhecida como um importante problema clínico, afetando populações sócio-economicamente atrasadas em países em desenvolvimento (AWE et al., 2011). Os mecanismos fisiopatológicos que levam ao desenvolvimento das doenças diarreicas incluem o trânsito intestinal acelerado, aumento da quantidade de fluidos no lúmen intestinal, e redução da absorção de água e eletrólitos (GORKIEWICZ et al., 2013). Atualmente, o tratamento farmacológico para as doenças diarreicas não é específico, sendo destinado a reduzir a inconveniência causada pelos movimentos intestinais frequentes, desidratação e desconforto (CHOI et al., 2014; AWE et al., 2011).

Considerando que PLS extraídos de algas marinhas possuem notável potencial farmacológico, incluindo efeitos moduladores gastrointestinais, este estudo destinou-se a avaliar o efeito antidiarreico do PLS extraído da alga marinha *H. musciformis* em modelos de diarreia aguda, inflamatória e secretória, bem como esclarecer os possíveis mecanismos envolvidos nessa atividade.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Produtos Naturais como Fonte de Recurso Terapêutico

O Brasil apresenta a maior biodiversidade do planeta, estimada em mais de 20% do número total de espécies do mundo. Apesar deste imenso patrimônio encontrar-se escasso nos países desenvolvidos, apresenta grande potencial econômico em várias atividades, principalmente na prospecção de fármacos (SAITO, BASTOS e ABEGG, 2008; CALIXTO, 2003). Isto pode ser confirmado ao analisar o crescente número de novos medicamentos obtidos direta ou indiretamente a partir de produtos naturais.

A perspectiva de obtenção de novos fármacos a partir de recursos naturais põe em evidência o aspecto da grande diversidade molecular, propriedades físico-químicas e biológicas. Isto contribui com a descoberta de medicamentos com potencial terapêutico diversificado (NISBET e MOORE, 1997). Além disso, vários motivos levam ao aumento do uso produtos naturais no combate a enfermidades ao invés do uso da medicina convencional, uma delas é que as drogas de origem sintética podem muitas vezes mostrar-se ineficientes ao tratamento de várias patologias, além de causarem muitos efeitos adversos relacionados ao uso prolongado, contribuindo com o surgimento de problemas de saúde (RATES, 2001). Na atualidade, o grande objetivo da farmacologia é a busca de drogas mais eficazes, com menos efeitos colaterais e menos possibilidades de recidivas que os fármacos existentes no mercado.

O uso de compostos naturais data desde os tempos antigos, assim essa sistemática acompanhou o desenvolvimento da sociedade humana e ainda hoje todos os aspectos ligados ao conhecimento sobre produtos de origem natural continuam evoluindo. Nas últimas décadas, cerca de um quarto das drogas utilizadas para fins medicinais foram oriundas de produtos naturais ou seus derivados (BALUNAS e KINGHORN, 2005). Mais de 40% dos produtos derivados de compostos naturais mostraram atividades que não foram atribuídas aos produtos sintéticos existentes no mercado de medicamentos (HENKEL et al., 1999).

O reino vegetal é responsável pela maior diversidade de compostos terapêuticos relatados na literatura até o momento. Contudo, nos últimos anos, organismos marinhos tornaram-se alvo para a descoberta de novos produtos farmacológicos e de interesse biomédico (CHAVES et al., 2012). Desse modo, desde o ano de 1970, mais de 21.855 compostos naturais bioativos, com distintas atividades biológicas foram descobertos a partir de organismos marinhos (BLUNT et al., 2012). Estes produzem uma grande quantidade de metabólitos

secundários que não podem ser encontrados em outros organismos e apresentam grande probabilidade de possuírem significativa atividade biológica maior do que a esperada para organismos terrestres. Nesse contexto, um estudo pré-clínico de citotoxicidade realizado pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) mostrou que 1% das amostras marinhas testadas demonstraram potencial antitumoral, enquanto apenas 0,1% das amostras terrestres mostraram tal atividade (MUNRO et al., 1999).

Em adição, os organismos marinhos apresentam potencial para tratar várias doenças e alguns destes recursos naturais ainda apresentam novos mecanismos de ação. Exemplo disso, pode ser apontado por drogas derivadas de compostos marinhos, já aprovadas, como a Ziconotida, que possui um potente efeito analgésico mediado pelo bloqueio reversível dos canais de cálcio do tipo N sensíveis a voltagem, inibindo a atividade de um subconjunto de neurônios incluindo nociceptores primários (MILJANIC et al., 2004). Ziconitida, é o primeiro bloqueador de canal de cálcio de tipo N e também é o primeiro medicamento derivado de peptídeo marinho ao chegar no mercado, sendo surpreendentemente 1.000 vezes mais potente do que a morfina, além de não produzir tolerância, fato que é bem observado na terapia opiácea (MAYER et al., 2010; MCGIVER, 2006). A droga antineoplásica Trabectedina também mostrou um mecanismo de ação único e complexo ao ligar-se ao sulco menor do DNA, curvando a hélice para o sulco maior. Esta ligação ao DNA desencadeia uma cascata de acontecimentos que afeta vários fatores de transcrição, proteínas de ligação ao DNA, bem como vias de reparação do DNA, resultando numa perturbação do ciclo celular (D' INCALCI e GALMARINI, 2010). Do mesmo modo, existem outros exemplos notáveis de compostos bioativos marinhos com novos mecanismos de ação e que atuam de maneira eficaz (MONTASER e LUESCH, 2011).

A cada ano tem aumentado o número de compostos derivados de organismos marinhos e mais de 1.000 novas substâncias com distintas atividades biológicas foram relatadas entre os anos de 2010 e 2011 (BLUNT et al., 2011; BLUNT et al., 2010). Dentre tais organismos, as algas têm atraído a atenção de vários grupos de pesquisa, uma vez possuem muitos compostos bioativos com várias ações terapêuticas, e portanto apresentam uma promissora área para a busca de novas alternativas (SILVA et al., 2011).

Acredita-se que a exploração do conhecimento científico em busca de novos medicamentos tem se tornado uma grande estratégia e um dos principais caminhos para o sucesso de pesquisa na área biotecnológica. Diante disso, pode-se sugerir que o alto grau de

inovação biotecnológica na área de produtos naturais pode desencadear a descoberta e o desenvolvimento de medicamentos derivados de algas marinhas com intensidade cada vez maior, dando espaço para um novo mercado farmacêutico no futuro.

2.2. Considerações sobre Algas Marinhas

As algas constituem organismos eucarióticos unicelulares ou multicelulares incluídos no Reino Protista, uma vez que não possuem características que os permitam ser classificados como elementos dos reinos Plantae, Fungi ou Animalia. Esta é a classificação mais bem aceita na atualidade, no entanto ainda existem divergências entre os evolucionistas, pois as relações filogenéticas deste grupo não encontram-se completamente elucidadas (RAVEN, EVERT e EICHHORN, 2007; VIDOTTI e ROLLEMBERG, 2004).

Dentre os organismos marinhos, as algas representam a base da cadeia alimentar, são produtoras primárias, sendo portanto fonte de carboidratos e proteínas para muitos seres vivos, além de serem responsáveis pela liberação significativa de oxigênio, através da atividade fotossintética (EL GAMAL, 2010). Assim, esses organismos assumem grande importância ecológica.

As algas podem ser classificadas de acordo com sua estrutura física, características bioquímicas de seus cloroplastos, substâncias de reserva, ciclo reprodutivo e coloração. Outras formas de classificação levam em consideração seus tamanhos, assim chamadas de microalgas ou macroalgas. O primeiro grupo compreende algas microscópicas, enquanto o segundo é formado por organismos macroscópicos. Baseado na filogenia, as macroalgas são representadas em três grupos principais: Phaeophyta (algas pardas), Chlorophyta (algas verdes) e Rhodophyta (algas vermelhas) (ANASTOPOULOS e KYZAS, 2015; VIDOTTI e ROLLEMBERG, 2004).

As algas marinhas são utilizadas a milênios como fonte de alimento. Mais de dois milhões de toneladas de algas frescas são processadas ao ano para obtenção de produtos alimentícios, principalmente em países orientais. Além disso, aproximadamente um milhão e meio de toneladas de algas são coletadas por ano para extração de biomoléculas de interesse econômico, como alginatos, ágar e carragenanas (DILLEHAY et al., 2008; VIDOTTI e ROLLEMBERG, 2004). No Brasil, as macroalgas vermelhas (Rhodophyta) são as mais exploradas e dentre estas, as algas dos gêneros *Gracilária* e *Hypnea* são as mais utilizadas, principalmente na região nordeste. A utilização das espécies do gênero *Gracilária* é voltada para a exportação e produção de ágar, enquanto as algas do gênero *Hypnea*, especialmente

Hypnea musciformis, é utilizada para produção de Kappa-carragenana, um ficocolóide de grande valor econômico utilizado como agente espessante e estabilizante em alimentos, cosméticos e fármacos (NAUER, CASSANO e OLIVERIA, 2014).

As algas marinhas constituem uma rica fonte de produtos naturais, incluindo ácidos graxos poli-insaturados, polissacarídeos, minerais e vitaminas, antioxidantes, enzimas e peptídeos bioativos (KIM e WIJESEKARA, 2010). Assim, nos últimos anos esses organismos marinhos vêm ganhando bastante enfoque em pesquisas, no mundo inteiro, devido a presença de compostos com atividades biológicas e toxicidade relativamente baixa, como os polissacarídeos sulfatados (PLS) (FLEITA, EL-SAYED e RIFAAT, 2015; ALVES et al., 2012).

Nas algas marinhas, os polissacarídeos estão presentes no componente amorfo da parede celular, conferindo flexibilidade e o aspecto mucilaginoso característico das algas (MICHEL et al., 2010; KLOAREG e QUATRANO, 1988). O componente amorfo encontrado na parede celular varia conforme a divisão das algas. As algas pardas produzem dois tipos de PLS, os alginatos e as fucanas, enquanto as algas verdes apresentam PLS formados por pelo menos cinco resíduos de monossacarídeos diferentes: D-galactose, ácido D-glucurônico, D-xilose, L-ramnose e L-arabinose. As algas vermelhas possuem PLS constituídos por repetições de monossacarídeos galactose, frequentemente chamados de galactanas sulfatadas comercialmente conhecidas como ágar e carragenana (SANTOS et al., 2012; JIAO et al., 2011; GUPTA e ABU-GHANNAM, 2011).

Em especial, as galactanas sulfatadas (PLS) encontradas em algas vermelhas geralmente possuem alta massa molecular (≥ 100 kDa) e compartilham uma estrutura básica comum, constituída por cadeias alternadas de resíduos de β (1 \rightarrow 3) D-galactopiranse e α (1 \rightarrow 4) D- ou L-galactopiranoose, que podem ser chamadas de unidade A e unidade B, respectivamente. A unidade α -galactopiranoose pode também apresentar-se na forma cíclica 3,6-anidro- α -galactopiranoose ou galactose-6-sulfato. Além disso, quando a unidade B pertencer a série D, sugere-se a ocorrência de carragenanas e quando pertencer a série L, sugere-se a ocorrência de ágares. Assim, os termos carragenana e ágar referem-se a classificação das galactanas de acordo com a estereoquímica da molécula relacionada a unidade B ou α - galactopiranoose (KNUTSEN et al., 1994; ROCHAS, LAHAYE e YAPHE, 1986). A variação estrutural das galactanas sulfatadas pode ocorrer entre as distintas espécies de algas vermelhas, bem como entre os

organismos coletados em ambientes distintos ou em diferentes períodos do ano (PEREIRA et al., 2005).

É importante lembrar que PLS são polímeros complexos e heterogêneos formados por unidades repetidas de monossacarídeos com carga negativa devido a presença de radicais sulfato, o que possibilita sua ligação a um grande número de proteínas no organismo (POMIN, 2010). Esta característica físico-química pode influenciar a diversidade das ações biológicas atribuídas a estas macromoléculas. As ações biológicas apresentadas pelos PLS incluem atividade gastroprotetora (SILVA et al., 2012; SILVA et al., 2011), antioxidante (BARAHONA et al., 2011), anticoagulante (CIANCIA, QUINTANA e CEREZO, 2010), antiviral (OHTA et al., 2009), antileishmania (PIRES et al., 2013), antimalárica (ADAMS et al., 2005), imunoestimulatória (ZHA et al., 2015), antineoplásica (SHAO et al., 2013), anti-inflamatória e antinociceptiva (CHAVES et al., 2012), dentre outras.

Os PLS são reconhecidos como modificadores exógenos de respostas biológicas e assim, pode-se sugerir que as atividades imunomodulatórias e anti-inflamatórias atribuídas aos PLS podem estar ligadas aos mecanismos de proteção gástrica e intestinal (WIJESEKARA, PANGESTUTI e KIM, 2011). Estudos têm revelado que os efeitos benéficos dos polissacarídeos sobre a saúde gastrointestinal incluem efeitos antagonistas e imunitários. Mesmo havendo significativos achados, existem poucos trabalhos elucidando os principais mecanismos de ação envolvidos no efeito protetor gastrointestinal dos PLS de algas marinhas. Por exemplo, PLS isolados das algas *Gracilária caudata* e *H. musciformis* exibiram potente atividade inibidora de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos através da ativação da via NO/K_{ATP}. Contudo, o efeito gastroprotetor pode também ter sido mediado, em parte, por mecanismos que envolvam a redução da peroxidação lipídica (DAMASCENO et al., 2013; SILVA et al., 2011). Em adição, estudos realizados com PLS isolados da espécie *Gracilária birdiae* demonstraram efeito protetor gastrointestinal através de mecanismos que envolvem a inibição da infiltração de células inflamatórias, liberação de citocinas e peroxidação lipídica (BRITO et al., 2013; SILVA et al., 2012).

2.3. Alga Marinha *Hypnea musciformis* e Polissacarídeos Sulfatados

O gênero *Hypnea* inclui aproximadamente 67 espécies distribuídas em regiões de águas quentes. Dentre as espécies desse gênero, *H. musciformis* (Figura 1) é a mais conhecida, com

ampla distribuição nos oceanos Atlântico, Índico e Pacífico e grande ocorrência ao longo do litoral brasileiro no trecho que se estende do Estado do Maranhão até o Rio Grande do Sul. Esta espécie pode ser encontrada em áreas de infra e meso litoral, crescendo como epífitas sobre outras espécies de algas ou sobre rochas (NAUER et al., 2014).

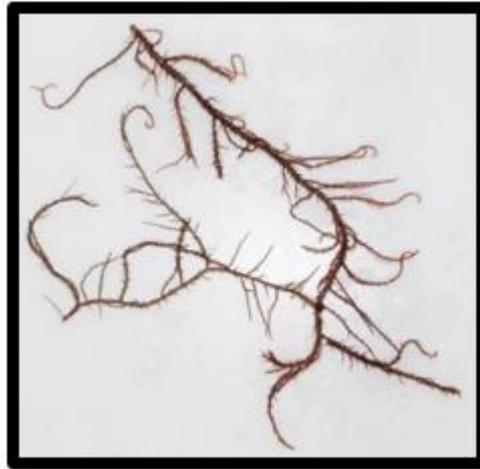


Figura 1. Alga Marinha Vermelha *Hypnea musciformis*. Fonte: autoria própria (07/2015)

O polissacarídeo isolado a partir de *H. musciformis* é uma carragenana composta principalmente por repetições de (\rightarrow 3)- β -D-galactose-4-sulfato conectado a (\rightarrow 4)-3,6-anidro- α -D-galactopiranosose. Como dito anteriormente, tal macroalga vermelha possui grande importância comercial na costa nordestina do Brasil por ser uma fonte natural de kappa-carragenana, o qual é utilizado de diferentes formas na atividade econômica, em especial a alimentícia (COZENZA et al., 2014; ARMAN e QADER, 2012; ALVES et al., 2012; AZIZA et al., 2008; VELDE et al., 2002; GREER et al., 1984). No Brasil, no ano de 2004, o consumo de carragenanas foi de 100 toneladas ao mês, dos quais 10 toneladas foram obtidas a partir dos bancos naturais de *H. musciformis* na região nordeste (FURTADO, 2004). Estudos recentes vêm enfatizando o potencial desse material como elicitador de plantas, apresentando atividade biológica contra o vírus do mosaico do tabaco (TMV) (GHANNAM et al., 2013; ARMAN e QADER, 2012). Além de suas aplicações industriais, estudos científicos realizados anteriormente com kappa-carragenana extraída de *H. musciformis* demonstraram que esse polissacarídeo possui potencial farmacológico anti-inflamatório (BRITO et al., 2013) gastroprotetor (DAMASCENO et al., 2012) e antioxidante (ALVES et al., 2012).

Diante das aplicações biológicas já apresentadas pelo PLS extraído a partir da alga marinha vermelha *H. musciformis*, especialmente devido ao seu efeito modulador gastrointestinal, considera-se importante verificar o potencial terapêutico desse material encontrado ao longo do litoral nordestino, em modelos experimentais que mimetizem a diarreia, uma vez que estudos específicos que explorem as ações dessas macromoléculas voltadas para tal aplicação, ainda são escassos e/ou encontram-se em fase de desenvolvimento.

2.4. Considerações Gerais sobre Diarreia

A diarreia é um distúrbio gastrointestinal caracterizado pelo aumento no número de evacuações, três ou mais vezes durante o dia, com aumento da consistência das fezes e/ou presença de sangue ou muco em casos de inflamação ou ulceração da mucosa intestinal (XU et al., 2013). Os mecanismos fisiopatológicos que caracterizam a doença diarreica incluem a redução da absorção ou uma hipersecreção de água e eletrólitos, juntamente com o aumento da motilidade intestinal (GORKIEWICZ et al., 2013). Pode-se inferir que a diarreia é um processo dinâmico, dependente do equilíbrio entre absorção de água no lúmen e a capacidade de secreção da mucosa intestinal. Em condições normais, o intestino delgado reabsorve aproximadamente 99% do fluido presente no lúmen intestinal e em situações em que a eficiência desse processo é reduzida em 1% pode resultar em fezes aquosas (SCHILLER, 2012). Portanto, mudanças relativamente sutis na absorção de água pelo intestino levam ao processo diarreico.

A mucosa intestinal é um epitélio complexo em que a absorção e a secreção ocorrem simultaneamente, onde a maior parte desses processos acontecem no intestino delgado. Conceitos atuais sobre o transporte de água e eletrólitos sugerem que a mucosa intestinal atua como uma membrana semipermeável, que contém poros nas junções intercelulares dos enterócitos. Assim, o fluxo de água é um evento totalmente passivo, que ocorre em respostas a gradientes osmóticos associados ao aumento na secreção de íons cloreto (Cl^-) ou bicarbonato (HCO_3^-) e uma redução na absorção de íons sódio (Na^+) e Cl^- (WHYTE e JENKIINS, 2012).

De acordo com os mecanismos fisiopatológicos, a diarreia pode ser considerada osmótica ou secretória. A primeira forma ocorre quando no lúmen intestinal há a presença excessiva de solutos poucos absorvíveis e osmoticamente ativos. Dessa forma, uma maior quantidade de fluido move-se passivamente dos enterócitos para o lúmen intestinal, o que consequentemente contribui com a redução da capacidade de absorção, e por conseguinte

ocasiona a diarreia. Partículas osmoticamente ativas podem estar presentes no lúmen intestinal devido a um grande número de razões, como por exemplo: ingestão de solutos pouco absorvidos, como laxantes osmóticos; má absorção de solutos específicos; danos na área de absorção da mucosa, como ocorre nas gastroenterites, alergia a proteínas do leite de gado, doenças de Crohn, e doença celíaca; desordens de motilidade, como na gastroenterite e na síndrome do intestino irritável. Por outro lado, a diarreia secretória ocorre quando a mucosa intestinal secreta quantidades excessivas de fluido, seja devido a ativação de uma via por uma toxina (como a toxina da cólera) ou anormalidade nos enterocitos (como a atrofia congênita das microvilosidades). Há casos de diarreia aguda e crônica em que as formas osmótica e secretória podem ocorrer simultaneamente, dependendo da causa subjacente (SCHILLER, 2012; WHYTE e JENKIINS, 2012; HAMMER et al., 1989).

Como dito anteriormente, o aumento da motilidade intestinal é um dos mecanismos que ocasiona o processo diarreico. Nesse sentido, a passagem acelerada do conteúdo intestinal pelos sítios de absorção ao longo do intestino interfere na capacidade de absorção. O trânsito intestinal acelerado é característico tanto da diarreia secretora, quando a absorção de água for incompleta, quanto da diarreia osmótica, se o processo de absorção de substâncias osmoticamente ativas não foi concluído (SPILLER, 2006).

Diante disso, para que uma droga seja considerada antidiarreica, é necessário que a mesma promova redução dos efeitos característicos da diarreia, ou seja, deve aumentar a absorção, ou reduzir a secreção intestinal e/ou ainda diminuir a propulsão intestinal.

É importante notar que muitos fatores podem ser responsáveis pelo aparecimento do processo diarreico, incluindo agentes infecciosos, toxinas, ansiedade e fármacos. A diarreia também é um efeito adverso frequente, perfazendo aproximadamente 7% dos efeitos colaterais associados ao uso de fármacos. Foi relatado que mais de 700 medicamentos podem causar diarreia, incluindo agentes colinérgicos, antiarrítmicos, antineoplásicos, análogos de prostaglandinas, colchicina, produtos contendo lactose ou sorbitol, antiácidos contendo magnésio, anti-inflamatórios não-esteroidais, antimicrobianos e muitos outros (MOON et al., 2015; CHASSANY, MICHAUX e BERGMANN, 2000). Além disso, o processo diarreico pode ser um sinal presente em algumas patologias, como por exemplo a AIDS, onde até 50% dos casos cursa com diarreia durante algum estágio da doença (JOOB e WIWANITKIT, 2014; BOUCHAUD, 1996).

2.5. Classificação Clínica da Diarreia

A classificação clínica da diarreia é geralmente baseada no tempo de duração. A diarreia considerada como aguda ocorre geralmente de maneira autolimitada, com tempo de duração inferior a duas semanas. A diarreia que permanece por 14 dias ou mais é considerada como persistente. E se a duração dos sintomas diarreicos é superior a um mês, o distúrbio é classificado como diarreia crônica (MATHAN, 1998).

2.5.1. Diarreia aguda

2.5.1.1. Diarreia infecciosa

A diarreia infecciosa aguda resulta da infecção intestinal por patógenos entéricos (bactérias, vírus, parasitas ou fungos) invasivos ou não invasivos, podendo ser acompanhada ou não por resposta inflamatória (MCCLARREN, LYNCH e NYAYAPATI, 2011).

A diarreia infecciosa não inflamatória geralmente é ocasionada no trato intestinal superior. Frequentemente, origina-se pela ação de toxinas produzidas por patógenos, as enterotoxinas, as quais provocam o aumento da secreção e do trânsito intestinal, resultando em uma diarreia aquosa. Este tipo de diarreia pode ser definido como intoxicação alimentar quando as enterotoxinas são geradas por microrganismos antes do consumo e os sintomas surgem em poucas horas após a ingestão. Em outras situações, as toxinas são formadas depois que há colonização do intestino delgado e o início dos sintomas é mais tardio (GUANDALINI, 2011). Em ambos os casos o microrganismo causador da diarreia é dito não invasivo. A infecção diarreica mais bem exemplificada deste grupo é a cólera, causada pela infecção da bactéria *Vibrio cholerae*. Outros exemplos incluem intoxicação alimentar causada por *Clostridium perfringens* e *Staphylococcus aureus*, infecções por *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC), parasitas e gastroenterites virais (KELLY, 2011). O norovírus é o principal agente etiológico envolvido com gastroenterites virais, acometendo adultos e crianças em todo o mundo (PANG e LEE, 2011).

A prevalência de distintos agentes etiológicos difere de uma área para outra, entre países desenvolvidos e em desenvolvimento, de acordo com as condições de saneamento e higiene, nível de instrução e pobreza. As possibilidades de identificação dos agentes etiológicos tem

aumentado com a melhoria das técnicas diagnósticas utilizadas atualmente. Contudo, o número de agentes etiológicos está em constante aumento (DINESEN e HARBORD, 2013).

2.5.1.2. Diarreia do viajante

A diarreia do viajante é a infecção mais comum ocasionada em indivíduos que se deslocam de viagem, sendo resultante da exposição do trato gastrointestinal a patógenos entéricos (MATHAN, 1998). Estima-se que 40 a 60% dos viajantes que se deslocam de regiões temperadas para regiões tropicais ou subtropicais são atingidas por essa infecção (KOLLARITSCH, PAULKE-KORINEK e WIEDERMANN, 2012).

Grande parte dos casos de diarreia do viajante são causados por bactérias e vírus, no entanto uma grande quantidade de microrganismos tem sido implicados, incluindo os protozoários. A frequência de cada patógeno varia de acordo com a localização geográfica e a causa pode ser desconhecida em 40% a 50% dos casos. A bactéria *E. coli* é o organismo mais propenso a causar a diarreia do viajante, sendo implicada em 40 a 70% das ocorrências. Os vírus e os protozoários podem ser detectados em até 35% dos casos. Norovírus e rotavírus são as causas virais mais comuns, enquanto os agentes infecciosos *Giardia lamblia* e *Entamoeba histolytica* são os principais parasitas envolvidos (HEARN e DOHERTY, 2013; AL-ABRI, BEECHING e NYE, 2005; CHANGNON, 1996).

2.5.2. Diarreia persistente

A diarreia persistente é caracterizada por episódios diarreicos com causa presumivelmente infecciosa, que começa com características agudas e dura de uma maneira inusitada, causando agravamento do estado nutricional e um elevado risco de morte. A diarreia persistente é responsável por altas taxas de morbidade e mortalidade predominantemente entre crianças. É estimado que 3 a 20% dos episódios de diarreia entre crianças menores de 5 anos de idade tornam-se persistentes, e que mais de 50% das mortes provocadas por diarreia estão associadas a tal forma. Dessa maneira, crianças portadoras de diarreia persistente necessitam de atenção redobrada afim de prevenir outros episódios de diarreia e deficiências relacionados ao crescimento (ANDRADE, MOREIRA e FAGUNDES-NETO, 2000; LIMA et al., 2000; GONZÁLEZ, CALVO e ARBELO, 1995).

Entre os agentes causadores, mais comuns, de diarreia persistente estão *E. coli* enteropatogênica (EPEC) e a *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *Salmonella*, *Klebsiella* e *Cryptosporidium* (ANDRADE et al., 2000). Em adultos, *Giardia duodenalis* é a causa mais comum de diarreia persistente, muitas vezes associada a perda substancial de peso, distensão abdominal e anorexia (KELLY, 2011).

2.5.3. Diarreia crônica

A diarreia crônica afeta aproximadamente 5% da população e é considerada uma importante causa de hospitalização. A diarreia crônica de origem infecciosa é pouco frequente, de forma que as infecções parasitárias ainda são as mais comuns, embora possam ser assintomáticas. Infecções bacterianas crônicas são mais raras e infecções fúngicas e virais crônicas são mais relatadas em indivíduos imunocomprometidos e crianças, sendo muito raras em indivíduos imunocompetentes (SCHILLER, 2012; KAISER e SURAWICZ, 2012). As etiologias mais comuns de diarreia crônica incluem má absorção de nutrientes e doenças inflamatórias intestinais (MOORE et al., 2010).

Clinicamente, a diarreia crônica pode ser dividida em síndrome de má-absorção (por exemplo, esprú tropical), diarreia crônica sem má-absorção (por exemplo, síndrome do intestino irritável) e diarreia crônica do imunodeficiente (GUARINO, VECCHIO e CANANI, 2012; MATHAN, 1998). O esprú tropical, também denominado de enteropatia ambiental, ocorre quase exclusivamente em indivíduos residentes nos trópicos ou que visitam esta região, principalmente áreas do sudeste da Ásia e na América do Sul. Caracteriza-se por má absorção devido a atrofia das vilosidades intestinais e inflamação do revestimento da mucosa do intestino delgado (LANGENBERG, WISMANS e VAN GENDEREN, 2014; BIRKENFELD, 2009).

2.6. A Cólera

A cólera é uma síndrome gastrointestinal infecciosa aguda, de extrema virulência, que acomete seres humanos (RANJBAR et al., 2008). O agente etiológico dessa infecção é a bactéria gram-negativa *Vibrio cholerae*, a qual é capaz de produzir uma enterotoxina que causa diarreia (MOHAMMAD et al., 2010). Suas manifestações clínicas variam de uma forma branda com quadro leve a uma forma mais grave, que manifesta-se com diarreia aquosa e abundante,

frequentemente acompanhada por vômito, dor abdominal e câimbras nas pernas, podendo evoluir para desidratação, acidose metabólica e choque, subsequentemente resultando em morte, se o tratamento não for prontamente iniciado de maneira adequada (MOORE et al., 2014; MANDAL, MANDAL e PAL, 2011). As fezes aquosas oriundas dessa infecção diarreica são principalmente caracterizadas como água de arroz, considerando que a medida que o fluido é perdido em grande quantidade, os espécimes de fezes tornam-se incolores e inodoros (SACK et al., 2004).

A infecção colérica apresenta grande disseminação, havendo registro de sua ocorrência em todos os continentes. Durante o século XIX, espalhou-se pelo mundo a partir dos seus nichos ecológicos da Índia, propagando-se da região de Bengala e do Delta do Ganges por toda a Europa e América quando começaram a ocorrer as pandemias. Seis pandemias subsequentes mataram milhões de pessoas em todas as regiões do mundo. A sétima e atual pandemia atingiu mais de 130 países, seguindo pela Ásia, África, Caribe, América Latina e Central (WHO, 2015; SANTOS, 1994).

A cada ano a cólera é responsável por aproximadamente 1,4 a 4,3 milhões de casos confirmados com 28.000 a 142.000 mortes em todo o mundo. Em 2014, um total de 190.549 casos de cólera com 2.231 mortes foram relatadas à OMS por 42 países. No Brasil, todas as regiões brasileiras foram afetadas a partir do ano de 1991 até 2001, chegando a ocasionar 168.598 casos e 2.035 óbitos. Contudo, a doença começou a retroceder após a implantação da campanha nacional de combate a cólera. A partir de 1995, a incidência limitou-se às regiões Norte e principalmente Nordeste por serem áreas com condições sócio-econômicas menos satisfatórias e condições ambientais favoráveis a disseminação da doença (BRASIL, 2014).

Atualmente, o Brasil vivencia um silêncio epidemiológico desde o ano de 2006, no entanto, locais que são aparentemente indenes podem possibilitar condições favoráveis a transmissão do vibrião colérico. Dessa forma, o Brasil mantém relações estreitas com países onde tem ocorrido surtos ou epidemias, havendo a possibilidade de reintrodução da infecção colérica. Nos anos de 2011 e 2012 foi identificada em São Paulo a ocorrência de casos oriundos da Angola (BRASIL, 2014). E estes acontecimentos fortalecem a hipótese de que a introdução da cólera em um país é algo que não pode ser evitado. Assim, há a necessidade do constante monitoramento com ações preventivas, especialmente voltadas ao tratamento da água. É importante lembrar, que a cólera ainda é um importante problema de saúde pública em países

em desenvolvimento com condições sanitárias e práticas de higiene inadequadas, apresentando potencial de alta letalidade e disseminação rápida (BHATTACHARYA et al., 2009).

A infecção colérica inicia a partir do consumo de água ou alimentos contaminados com o agente etiológico. A bactéria *V. cholerae* coloniza o intestino delgado do hospedeiro, multiplica-se no seguimento proximal e permanece no lúmen intestinal durante a progressão da doença produzindo enterotoxina (KAPER, MORRIS e LEVINE, 1995). A Toxina da Cólera (TC), secretada principalmente no jejuno do intestino delgado, é a principal responsável pela severa diarreia, embora todo o mecanismos fisiológico da cólera possa ser resultado do sinergismo de mais alguns fatores de patogenicidade (FARUQUE, ALBERT e MEKALANOS, 1998; KAPER et al., 1984; COSTER et al., 1995).

A TC possui uma subunidade A e cinco subunidades B, as quais formam uma estrutura AB₅ (POPOFF e POULAIN, 2010). A subunidade ativa TCA, composta por dois polipeptídeos A₁ e A₂, é responsável em grande parte pela ação tóxica da toxina. Enquanto a subunidade B, não tóxica, é formada por 5 peptídeos dispostos em anel pentamérico. O poro TCB interage com a subunidade A₂ e mantém a estrutura da toxina (TINKER, ERBE e HOLMES, 2005). As cinco subunidades B, por sua vez, ligam-se com alta afinidade ao receptor monossialogangliosídeo-GM1 presente na superfície das células epiteliais intestinais (enterócitos) (LENCER, 2004). Após a ligação da TC ao receptor celular, a toxina é internalizada nas células intestinais, via endocitose mediada pelo próprio receptor GM1 (LU et al., 2005). TC segue por transporte retrógrado do complexo de golgi até o retículo endoplasmático, onde TCA é clivada, e o componente A₁ é secretado no citoplasma, enquanto que a subunidade A₂ e a subunidade B permanecem no retículo endoplasmático. Assim, A₁ promove a ativação da adenilato ciclase (AC) após catalisar a transferência de uma unidade ADP-ribose a partir do NAD⁺ para um resíduo de arginina de proteína G α . Este processo inibe a hidrólise de GTP da proteína G α , o que mantém a AC ativada e portanto aumenta os níveis do mensageiro intracelular monofosfato cíclico de adenosina (AMPc). Quantidades cada vez maiores de AMPc nas células epiteliais intestinais promovem a abertura do canal de Cl⁻, o regulador de condutância transmembrana da fibrose cística (CFTR), por meio da fosforilação mediada pela proteína quinase A (PKA), estimulando a volumosa secreção dos íons cloreto (Cl⁻) no lúmen intestinal. Além disso, água, íons sódio e potássio, bicarbonato e outros eletrólitos são perdidos devido ao gradiente osmótico e elétrico causado pela perda de Cl⁻ (Figura 2) (MANDAL, MANDAL e PAL, 2011; BROECK, HORVATH e WOLF, 2007; O' NEAL et al., 2005; PINA e JOHANNES, 2005). O volume secretado excede o capacidade de absorção

normal do intestino e dessa forma, ocorre a severa diarreia com desidratação, que é característica da cólera.

A secreção intestinal induzida pela TC pode ser amplificada pela ativação secundária das células enterocromafins e dos nervos entéricos, que por sua vez liberam reguladores neuro-humorais do transporte como, por exemplo, serotonina (5-HT), acetilcolina, peptídeo intestinal vasoativo (VIP) e óxido nítrico (NO), os quais provocam sinergicamente a secreção de água e eletrólitos (POPOFF e POULAIN, 2010).

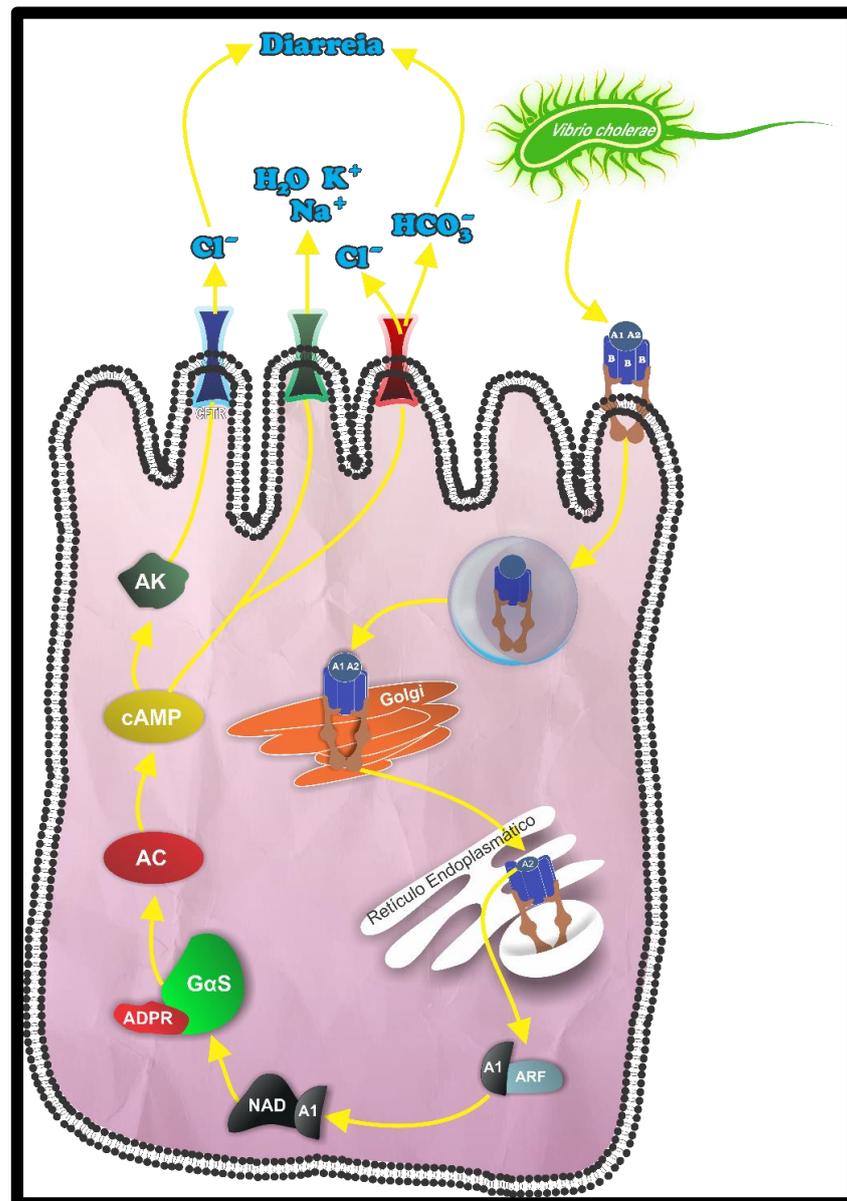


Figura 2. Esquema do mecanismo de ação da toxina da cólera (TC) nos enterócitos. Fonte: Adaptado de Broek e colaboradores (2007).

2.7. Características Epidemiológicas da Diarreia

Nos países em desenvolvimento, onde as condições higiênico-sanitárias são deficientes, a diarreia apresenta-se sob forma endêmica, com frequentes episódios de surtos. Estima-se que a diarreia responda por cerca de 2,2 milhões de mortes ao ano em todo o mundo e que cerca de 88% das mortes são atribuídas ao saneamento inadequado, má qualidade da água e falta de higiene. As crianças menores de 5 anos são as mais comumente atingidas, e nas quais se verifica a maior letalidade, principalmente quando existe a associação com desnutrição ou outras patologias infecciosas. Em crianças, a mortalidade global é de aproximadamente 1,5 milhões a cada ano (CARVALHO et al., 2015; RAHMAN et al., 2013; SINGH et al., 2012; BOSCHIPINTO, VELEBIT e SHIBUYA, 2008). O motivo pelo qual a diarreia incide principalmente nas crianças deve-se ao fato das mesmas estarem mais expostas aos riscos e apresentarem maior massa relativa de tecido adiposo que não fixa água, o que as torna mais susceptíveis. De acordo com um relatório divulgado pelo Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF) e a Organização Mundial da Saúde (OMS), a doença mata mais crianças do que a AIDS, a malária e o sarampo juntos. Dessa forma, constitui a segunda maior causa de mortalidade infantil (UNICEF, 2009).

O Brasil é um dos países com alta incidência de diarreia, onde 50% dos casos estão concentrados na região nordeste do país. Somente no ano de 2012, ocorreram 4.363.912 casos de doenças diarreicas agudas, sendo notificados 3.284 óbitos no país (BRASIL, 2013).

Especificamente no Piauí, um dos Estados brasileiros mais carentes, somente no ano de 2013, cerca de 100 mil casos de diarreia foram notificados, havendo no mesmo período o registro de 126 óbitos em todo o estado. Além disso, nesse mesmo ano foram registrados oito surtos de diarreia, onde metade dos registros ocorreu apenas em Teresina. Em 2014, os números continuaram alarmantes, havendo 7.279 casos de diarreia no estado (SESAPI, 2014).

Segundo dados do Sistema Informatizado de Vigilância Epidemiológica/Monitorização das Doenças Diarreicas Agudas (SIVEP/MDDA), nos últimos 9 anos (2007 a 2015), foram notificados 13.332 casos de diarreia aguda em crianças menores de 5 anos na cidade de Parnaíba. Ao todo, 35.260 pessoas foram atingidas por essa condição na cidade, durante esse mesmo intervalo de tempo. Durante esse período, o ano de 2014 apresentou as maiores estimativas, resultando em um total de 5.665 notificações.

Dessa forma, as doenças diarreicas constituem um problema de saúde pública e de ordem mundial. A persistência dessa enfermidade tem acarretado perda econômica significativa para o país e diversos males às populações.

2.8. Tratamento das Doenças Diarreicas

Atualmente não há tratamento efetivo para doenças diarreicas, de forma que as opções terapêuticas existentes não são específicas e usualmente são destinadas a reduzir a desidratação, o desconforto e a inconveniência causada pelos frequentes movimentos intestinais (CHOI et al., 2014; AWE et al., 2011).

A complicação mais frequente e imediata das doenças diarreicas é o desequilíbrio hidroeletrolítico, que leva à desidratação, hiponatremia e hipocalemia e geralmente é a causa básica do óbito. Em casos em que há leve a moderada desidratação, a terapia com solução de reidratação oral (SRO), exerce importante papel na reposição dos fluidos e tem sido substancialmente importante no salvamento vidas, diminuindo a mortalidade ocasionada pela diarreia desde a sua implementação pela OMS em 1960. A terapia com SRO tem sido comumente usada no tratamento de doenças diarreicas agudas, especialmente em crianças, bem como na diarreia do viajante, e ainda na hidratação dos pacientes com diarreia crônica. O tratamento com o emprego das SRO (mistura de água, açúcar e eletrólitos) é feito com base na observação de que a glicose é ativamente absorvida no intestino delgado, mesmo durante a diarreia, e o transporte ativo de glicose é vantajoso porque está acoplado à absorção de sódio, que, por sua vez, promove a absorção de água para diminuir a desidratação. Assim, a taxa de absorção de água e solutos é superior à secreção. Isto explica a grande eficiência da terapia com SRO no tratamento da doença. Contudo, a SRO não contribui com a diminuição do volume das fezes (severidade da diarreia) e nem com a frequência de evacuação (duração da diarreia). Nos últimos anos, vários estudos têm sido realizados na tentativa de desenvolver formulações de SRO que possam contribuir com benefícios clínicos além do tratamento da desidratação (SALAKO et al., 2015; WHYTE e JENKIINS, 2012; LI e VAZIRI, 2012; MUNOS, WALKER e BLACK, 2010; PALOMBO, 2006).

A terapia com antibióticos no tratamento das doenças diarreicas deve ser recomendada apenas em casos específicos para o controle da diarreia infecciosa, principalmente em episódios de diarreia ocasionados por *V. cholerae*, *E. coli*, diarreia por *C. difficile* fracamente

sanguinolenta, infecção sistêmica por *Aeromonas* e *Shiguelloses* (HEARN e DOHERTY, 2013). Geralmente, a antibioticoterapia faz necessário um diagnóstico microbiológico para identificação o agente causador e conseqüente indicação do medicamento mais adequado (LI e VAZIRI, 2012). Contudo, a terapia com antibióticos têm suas limitações devido ao fato de não inibir diretamente as toxinas produzidas por bactérias e devido ao desenvolvimento da resistência bacteriana. Além disso, o uso mal indicado de antibióticos pode perdurar a diarreia por impedir o desenvolvimento normal da flora bacteriana do intestino (RIVERA et al., 2013).

Outros produtos farmacêuticos que têm mostrado boa aplicação no controle da diarreia são os probióticos. Estes contém microrganismos vivos que, se administrados em quantidades adequadas, promovem um efeito benéfico ao manter o equilíbrio da microbiota intestinal do hospedeiro e ajudam a reduzir a colonização por microrganismos patogênicos através da adesão à mucosa intestinal (XIE, WANG e CHEN, 2015). A eficácia dos probióticos depende da espécie e da viabilidade dos microrganismos que são utilizados nas preparações. Os probióticos mais estudados e que já são disponibilizados em preparações farmacêuticas são *Lactobacillus* sp., *Bifidobacteria* sp., e o VSL#3 (uma preparação contendo *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* e *Streptococcus* sp.) e a levedura não patogênica *Saccharomyces boulardii* (LI e VAZIRI, 2012). Os probióticos têm demonstrado efeito benéfico na prevenção da diarreia ocasionada por antibióticos, no tratamento da diarreia infecciosa aguda, assim como na diarreia ocasionada por *C. difficile* (JONKERS e STOCKBRUGGER, 2007). No entanto, o potencial papel destes agentes no tratamento de diarreia persistente é muito pouco conhecido. Além disso, o efeito dos probióticos para prevenir a diarreia do viajante não está suficientemente demonstrado e alguns trabalhos são contraditórios (APONTE et al., 2010).

Além disso, o uso de preparações absorventes tem sido descrito no tratamento das doenças diarreicas. Os absorventes atuam ligando-se a substâncias nocivas, como fluidos, toxinas, bactérias e vírus no intuito de melhorar a consistência das fezes e/ou eliminar agentes nocivos e ainda reduzir a inflamação. Porém, mais estudos ainda são necessários para comprovar sua adequação. Ademais, seu uso é associado a efeitos colaterais como constipação, desconforto abdominal, hiperpigmentação das fezes e da língua e confusão (zumbido). Estão entre as preparações absorventes: salicilato de bismuto, diosmectite e suplementos de fibras. (LI e VAZIRI, 2012; GORBACH, 1990).

Os opioides têm sido utilizados como medicamentos antidiarreicos durante muitos séculos e dentre os tratamentos inespecíficos da diarreia, os mesmos são considerados os mais

eficazes, recebendo há um tempo atrás o título de “padrão ouro” ao ser comparado com outros agentes antidiarreicos. Sua atividade antidiarreica é mediada através de efeitos agonistas sobre o receptor μ -opioide na parede intestinal, que resulta em eficiente redução do peristaltismo em vários segmentos do intestino e aumento secundário da absorção de fluidos e eletrólitos. Assim, o resultado final é o aumento do tempo de trânsito intestinal, redução do volume fecal, bem como aumento da viscosidade das fezes. Um aspecto a ser observado é que esses antidiarreicos produzem paralisia intestinal e, se a diarreia estiver associada a infecção, esta poderá continuar a se proliferar, criando potencial para ruptura intestinal secundária à infecção em expansão. Além do efeito de paralisia intestinal, essa classe de antidiarreicos muitas vezes causa constipação, sonolência, náusea, vômito, cólicas abdominais, dependência e depressão respiratória se tomados por período prolongado. Os opiáceos mais usadas no controle dos sintomas da diarreia são: loperamida, codeína, difenoxilato, racecadotril e elixir paregórico, (SCHILLER, 2004; MEERVELD et al., 2004; DE SCHEPPER et al., 2004).

Dentre os opioides citadas acima, a loperamida já foi a droga de escolha popular para o tratamento da diarreia, uma vez que demonstra ser muito potente, específica, tem ação prolongada, não tem efeitos sobre o sistema nervoso central (SNC) e possui formulações variadas, incluindo comprimidos, cápsulas e solução oral. Em adição, não tem efeitos analgésicos ou de euforia, mesmo em doses elevadas, por causa de sua baixa circulação sistêmica e incapacidade de atravessar a barreira hematoencefálica. Contudo, o uso pediátrico da loperamida foi proibido, não sendo recomendada para o tratamento de diarreia aguda em crianças menores de três anos, visto que as crianças são mais sensíveis aos efeitos colaterais que os adultos devido a formação incompleta da barreira hematoencefálica. Os efeitos secundários mais comuns estão relacionados com o impacto sobre a motilidade intestinal, incluindo dor abdominal, distensão, inchaço, náuseas, vômitos e constipação. Além disso, essa droga é metabolizada pelo sistema do citocromo P450 (CYP450), e por conseguinte o risco de efeitos colaterais podem ser aumentados quando o pacientes apresenta doenças hepáticas ou quando há administração combinada com inibidores do CYP450 (LI e VAZIRI, 2012; LI, GROSSMAN e CUMMING, 2007).

Os agentes antiespasmódicos também desempenham um papel no tratamento da diarreia. Os antagonistas dos receptores muscarínicos (anticolinérgicos) reduzem o espasmo e aliviam cólicas ao inibirem a atividade parassimpática. Dessa forma, exercem efeito sobre a motilidade intestinal, bloqueando a ligação do neurotransmissor acetilcolina ao receptor. Entre os antiespasmódicos mais utilizados estão: atropina, metilcobalamina, propantelina,

dicloclomina, hiosciamina e glicopirrolato. Estes agentes também apresentam restrições na terapia primária na diarreia devido aos efeitos indesejáveis exercidos sobre outros sistemas, como ações periféricas relacionadas ao estado de boca seca, hipertermia, visão turva, pele seca, aumento do tamanho da pupila, retenção urinária, taquicardia e constipação, bem como efeitos adversos centrais que incluem dificuldade de concentração, déficit de atenção e confusão (zumbido) (LI e VAZIRI, 2012; ENCK et al., 2010).

Diante dessa problemática, muitos estudos vêm sendo realizados na tentativa de encontrar drogas que atuem na secreção e na motilidade gastrointestinal, reduzindo deste modo a consistência das fezes e a frequência da defecação, sem causar muitos efeitos colaterais.

2.9. Uso do Óleo de Rícino como Agente Laxativo

O óleo de rícino é um agente laxativo extraído das sementes da planta *Ricinus communis* (SARIM, NARVAL e BAFINA, 2013), a qual é conhecida popularmente como mamona. A atividade diarreica associada ao óleo de rícino é atribuída ao seu princípio ativo, o ácido ricinoleico (ácido 12-hidroxi-9-cis-octadecenóico). Após a ingestão do óleo da mamona, o ácido ricinoleico é liberado por lipases no lúmen intestinal e quantidades consideráveis desse metabólito ativo são absorvidas no intestino (TUNARU et al., 2012). Consequentemente, o ácido ricinoleico causa forte efeito laxativo, uma vez que reduz a absorção, aumenta a secreção de água e eletrólitos, bem como estimula a contratilidade da musculatura lisa do intestino, acelerando o trânsito intestinal. A ação é rápida e contínua até que o agente seja excretado pelo cólon. A atividade laxativa do óleo de rícino tem sido associada com injúrias no epitélio intestinal, liberação e/ou interação entre vários mediadores endógenos, ou outros efeitos não específicos (CROCI et al., 1997). Muitos mecanismos têm sido propostos para a diarreia induzida por esse agente catártico.

O óleo de rícino é um irritante local, levando portanto a alterações na integridade das células epiteliais, que envolve mudanças na permeabilidade intestinal (MASCOLO et al., 1993). Dessa forma, este laxante pode induzir resposta secretória pela redução da atividade da proteína transmembranar $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}$ presente nos enterócitos do intestino delgado e no cólon. A redução da atividade dessa proteína reduz a absorção de Na^+ e K^+ , bem como favorece o acúmulo de água e eletrólitos. A inibição intestinal de $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}$ está entre os

mecanismos sugeridos para explicar os efeitos de vários laxantes envolvendo o transporte intestinal de eletrólitos (GANGINELLA et al., 1975).

O processo inflamatório agudo ocasionado na mucosa intestinal após a liberação do ácido ricinoleico, leva ao recrutamento de polimorfonucleares e a liberação de mediadores endógenos, como as prostaglandinas E₂ (PGE₂) no lúmen intestinal (LUDERER et al., 1980; AWOUTERS et al., 1978).

A PGE₂, produto da metabolização do ácido araquidônico (AA) pelas enzimas ciclo-oxigenases (COX)-2, é responsável por várias ações importantes em processos fisiopatológicos ao ligar-se aos seus receptores específicos (EP1-4). Assim, a PGE₂ está envolvida no aumento da permeabilidade vascular, migração de leucócitos, e também na ativação de outras moléculas pró-inflamatórias, tais como bradicinina, serotonina e taquicinininas (SCHMIDT et al., 1996; KAWAHARA et al., 2014). Em adição, tal prostanoide é considerado importante agente envolvido na indução da diarreia em seres humanos e em animais experimentais, por estar associado com a redução da absorção e indução da secreção de água e eletrólitos (BEUBLER e JUAN, 1979). A liberação de PGE₂ pode culminar com a abertura de canais iônicos, como o CFTR, com consequente secreção de Cl⁻ para o lúmen intestinal. O acúmulo de cloretos gera um gradiente eletroquímico que favorece a atração de sódio e água para o lúmen (por meio da via paracelular) (AWOUTERS et al., 1978). Além disso, a PGE₂ pode também atuar afetando a motilidade intestinal a partir da interação com receptores EP3 presentes no músculo liso intestinal, uma vez que tal receptor induz ações relacionadas a propulsão intestinal, constituindo um importante alvo para efeitos laxativos (SHAHBAZIAN et al., 2002).

Outro mediador envolvido na indução da diarreia por óleo de rícino é o NO. A literatura mostra que esse mediador pode estimular a secreção intestinal de eletrólitos, associada ao aumento da motilidade da musculatura lisa gastrointestinal. Inicialmente foi demonstrado que NG-nitro-L-arginina metil-éster (L-NAME) e NG-monometil-L-arginina (L-NMMA), inibidores reversíveis da enzima óxido nítrico sintase (NOS), reduziram a secreção intraluminal de água e o acúmulo de Na⁺ induzidos por óleo de rícino, sugerindo o envolvimento do NO na atividade diarreica (MASCOLO et al., 1993). Outros estudos demonstraram que L-NAME e L-NMMA reduziram a atividade contrátil no íleo *in vitro* (IZZO et al., 1993) e a motilidade intestinal *in vivo* induzidas pelo ácido ricinoleico (MASCOLO et al., 1994).

A liberação do ácido ricinoleico no intestino delgado pode ativar a AC com consequente aumento de AMPc, havendo acúmulo de secreção no intestino delgado e cólon (RACUSEN e

BINDER, 1979). Em adição, existem evidências do envolvimento do fator ativador de plaquetas (PAF) e de taquicininas (por meio da ativação dos receptores NK1 e NK2) no efeito catártico do óleo da mamona, uma vez que contribuem para a ocorrência de danos na mucosa, aumento da permeabilidade no intestino e contratilidade do músculo liso intestinal (PINTO et al., 1989; CROCI et al., 1997).

Embora vários mecanismos tenham sido propostos para a atividade laxativa do óleo de rícino, ainda não foi possível definir com clareza seu mecanismo de ação. Contudo, a capacidade secretória, bem como o relaxamento do músculo liso, associados com a redução da consistência das fezes e aumento da defecação, ocasionados após sua administração, o tornam um bom agente para o estudo de sintomas e mecanismos associados às doenças diarreicas.

3. JUSTIFICATIVA

As doenças diarreicas configuram um importante problema que afeta a qualidade de vida da população, principalmente das crianças, implicando numa carga considerável de morbidade e mortalidade e, conseqüentemente importantes demandas para a rede de serviços de saúde. Atualmente, a incidência de diarreia permanece alta em países em desenvolvimento, como o Brasil, apesar dos esforços desempenhados pelos governos ou por organizações internacionais para contê-la. Para combater o problema da diarreia, em países em desenvolvimento, a OMS instituiu um programa de controle de doenças diarreicas, que inclui estudos de novos medicamentos antidiarreicos, inclusive oriundos de produtos naturais, juntamente com práticas de educação em saúde e abordagens de prevenção. Vários estudos têm sido descritos utilizando principalmente extratos ou compostos purificados derivados de plantas como antidiarreicos. Contudo, o uso de produtos naturais oriundos de algas marinhas, como os PLS, é uma prática que apresenta papel relevante em aplicações farmacológicas. Esses dados associados com os efeitos moduladores gastrointestinais oriundos do PLS extraído da alga marinha *H. musciformis* descritos na literatura, justifica a investigação da potencialidade fitoquímica deste produto natural em alterações intestinais, como as doenças diarreicas, visto que constituem a manifestação clínica mais frequente relacionada com doenças gastrointestinais e que atualmente não existe um tratamento específico destinado a esse problema clínico.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Avaliar o potencial antidiarreico do polissacarídeo sulfatado (PLS) extraído a partir da alga marinha vermelha *Hypnea musciformis* em modelos experimentais de diarreia osmótica, inflamatória e secretória, bem como esclarecer os possíveis mecanismos envolvidos nessa atividade.

4.2. Objetivos Específicos

- Descrever a ação do PLS na diarreia induzida por óleo de rícino em ratos;
- Investigar a atividade do PLS no acúmulo do fluido intestinal (*enteropooling*) induzido por óleo de rícino e PGE₂ em ratos;
- Analisar a ação do PLS na atividade da proteína Na⁺ K⁺ ATPase, presente nos enterócitos do intestino delgado de camundongos, após a indução da diarreia com óleo de rícino;
- Investigar a ação do PLS no mecanismo opioide em modelo de trânsito intestinal induzido por óleo de rícino em camundongos;
- Investigar a ação anticolinérgica do PLS em modelo de trânsito intestinal induzido por betanecol em camundongos;
- Descrever o efeito do PLS no esvaziamento gástrico em camundongos;
- Analisar a atividade antissecretória do PLS no modelo de diarreia secretória induzida pela toxina da cólera (TC) em alças intestinais isoladas de camundongos;
- Investigar o efeito do PLS na concentração de íons cloreto presente na secreção de fluido induzida pela TC em alças intestinais isoladas de camundongos;
- Avaliar a influência do PLS na absorção intestinal em alças isoladas de camundongos;
- Analisar a capacidade de ligação do PLS ao receptor GM1.

5. METODOLOGIA

5.1. Coleta e Processamento da Alga Marinha *Hypnea musciformis*

A alga marinha vermelha *H. musciformis* foi coletada junto ao substrato arenoso na região de mesolitoral, na praia de Flecheiras, município de Trairí, Ceará. Após a coleta, espécies foram depositadas no Herbário Ficológico de Ciências do Mar da Universidade Federal do Ceará (UFC). As amostras foram cuidadosamente lavadas com água destilada, sendo retirados sal e epífitas, e os exemplares coletados foram estocados a -20°C para posterior utilização.

5.2. Extração dos Polissacarídeos por Digestão com Papaína (Enzimática)

As carragenanas foram extraídas por digestão proteolítica (FARIAS et al., 2000). A alga seca (5 g) foi suspensa em 250 ml de tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 6,0), contendo 510 mg de papaína, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 5 mM e cisteína 5 mM, e a seguir, foram incubados durante 2 horas, a 60 °C. Posteriormente, o material foi filtrado em malha fina e centrifugado (2700 rpm; 25 min; 4 °C). Os polissacarídeos presentes no sobrenadante do material centrifugado foram precipitados com 16 ml de solução de cloreto de cetilpiridínio (CPC) 10%. Logo após a precipitação, o material foi novamente centrifugado (2700 rpm; 25 min; 4 °C), os polissacarídeos (κ -carragenana) foram lavados com 250 ml de solução de CPC 0,05% e depois dissolvidos em 175 ml de solução NaCl 2 M e etanol absoluto (100:15, v/v). Os polissacarídeos de tal mistura foram precipitados com 300 ml de etanol absoluto. Após 24 h, a 4°C, o precipitado foi recolhido por centrifugação (2700 rpm; 25 min; 4 °C), e lavado duas vezes com 250 ml de etanol 80% e etanol absoluto, seguindo-se secagem por fluxo de ar quente (60 °C).

5.3. Drogas e Reagentes

O óleo de rícino, prostaglandina E₂ (PGE₂), toxina da cólera (TC) e monossialogangliosídeo-GM1 foram adquiridos junto a Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA). Cloridrato de loperamida e naloxona são oriundos da Janssen-Cilag Pharmaceuticals LTDA (São Paulo, Brasil) e Cristália Pharmaceutical Chemicals LTDA (Nova

Itapira, Brasil), respectivamente. Sulfato de atropina foi adquirido junto a Isofarma Industrial Farmacêutica LTDA (Fortaleza, Brasil) e cloridrato de betanecol foi comprado na Farmácia de Manipulação Galeno (Teresina, Brasil). Outros reagentes químicos foram de grau analítico e obtidos a partir de fornecedores comerciais. Todas as drogas foram dissolvidas em salina ou tampão fosfato salina (PBS).

5.4. Animais

Para a realização dos experimentos foram utilizados ratos (variedade Wistar), pesando entre 150-180 g e camundongos (variedade Swiss) pesando entre 25-30 g, de ambos os sexos, obtidos do Biotério Setorial do Centro de Pesquisa de Plantas Medicinais, da Universidade Federal do Piauí. Os animais foram mantidos em gaiolas e acondicionados no laboratório com temperatura controlada de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, em ciclo de 12 h claro/12 h escuro, com livre acesso a ração (dieta padrão) e água *ad libitum*. Os grupos experimentais consistiram de 5 a 6 animais por grupo para o tratamento com PLS, droga de referência e controle tratado com salina. Antes dos experimentos os animais foram submetidos a jejum de 18 a 24 horas, mas tiveram acesso livre a água. Os animais foram eutanasiados após anestesia com tiopental sódico (100 mg/kg, *i. p.*). Os procedimentos e protocolos experimentais utilizados nesse estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará (Protocolo n° 11/2013) (Anexo I). Todos os tratamentos dos animais e procedimentos cirúrgicos foram realizados de acordo com as normas internacionalmente aceitas para utilização de animais em projetos de pesquisa e do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal).

5.5. Avaliação da Eficácia Antidiarreica do Polisacarídeo Sulfatado (PLS) Extraído da Alga Marinha Vermelha *Hypnea musciformis*

5.5.1. Diarreia induzida por óleo de rícino

A diarreia foi induzida com óleo de rícino de acordo com o método previamente descrito por Awouters e colaboradores (1978), com modificações. Os ratos foram divididos aleatoriamente em seis grupos e deixados em jejum por 18 horas antes dos experimentos, com livre acesso a água. Os grupos tratados foram separados como segue: Salina (2,5 ml/kg; grupo

I), PLS nas doses de 10, 30 e 90 mg/kg (grupos II, III e IV, respectivamente), loperamida, um agente padrão antidiarreico (5 mg/kg; grupo V), e apenas veículo (grupo VI). Os tratamentos foram administrados por via oral. As doses e a via de administração do PLS foram escolhidas de acordo com DAMASCENO e colaboradores (2013). Após 1 hora do pré-tratamento, o óleo de rícino (10 ml/kg, *v.o.*) foi administrado para os grupos experimentais (grupos I a V) para indução da diarreia, enquanto o grupo VI recebeu apenas salina (2,5 ml/kg, *v.o.*). Após a indução da diarreia, os animais foram deixados em caixas forradas com papel absorvente, por 3 horas, para detectar as características de fezes diarreicas, incluindo a avaliação do número total de fezes (mg) e o número total de fezes diarreicas (mg) excretado por cada grupo. Para isso, foi avaliado o peso do papel absorvente antes da administração de óleo de rícino e 3 horas após a administração, de forma que o peso foi mensurado com as fezes sólidas e sem as fezes sólidas. A eficácia de cada tratamento foi expressa como porcentagem de inibição (%) da defecação e da diarreia, sendo comparada com o grupo controle, o qual foi expresso como 100%. A porcentagem de inibição para defecação e da diarreia foi calculada a partir da seguinte expressão:

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

Onde: A representa a massa média da defecação induzida pelo óleo de rícino; B representa a massa média da defecação após o tratamento com a droga utilizada ou PLS extraído de *H. musciformis*.

Além disso, a severidade da diarreia induzida por óleo de rícino foi caracterizada de acordo com a consistência das fezes presentes na região perianal dos animais como escores numéricos (0-3) (Figura 3), onde: 0 = fezes normais (ou ausência de diarreia); 1 = fezes semi-sólidas (ou aspecto úmido); 2 = pequena ou moderada quantidade de fezes pastosas; e 3 grande quantidade de fezes pastosas (DICARLO et al., 1994).

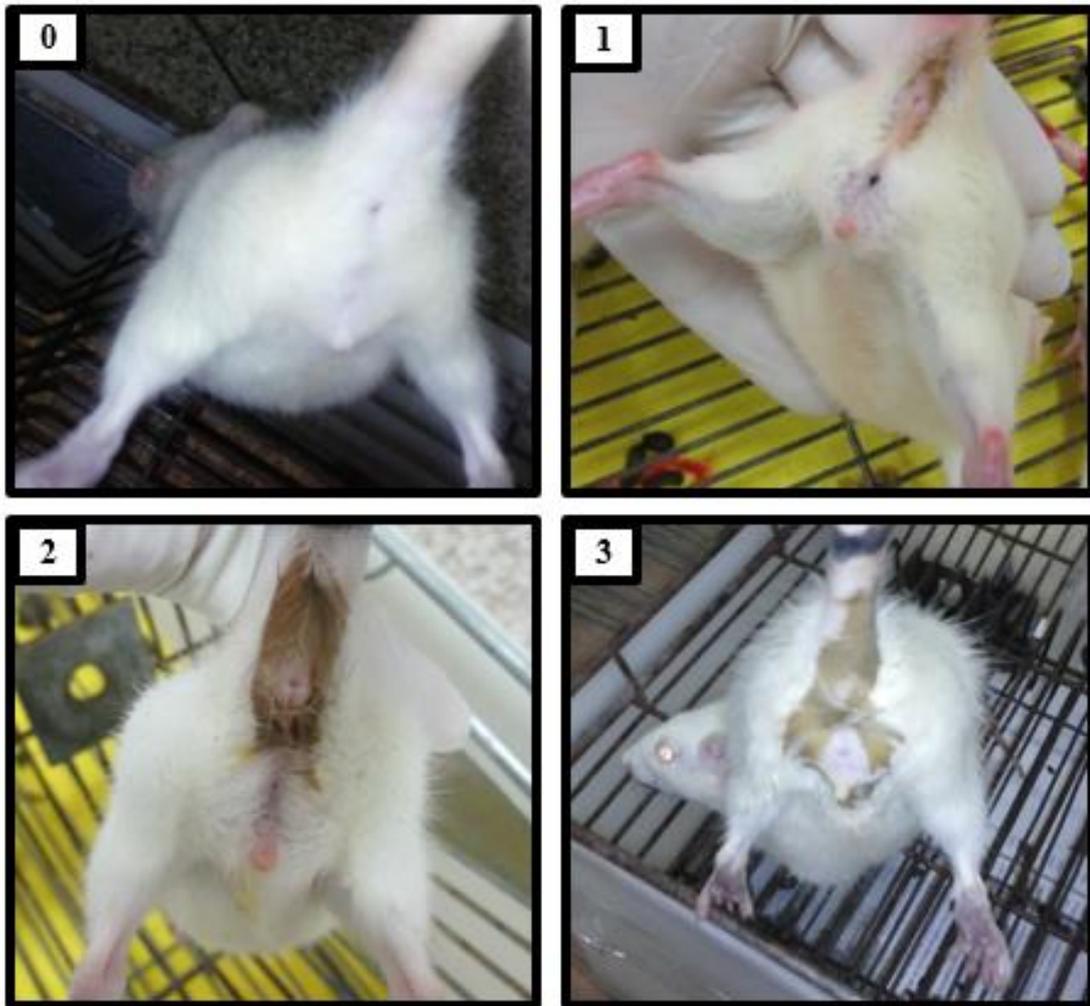


Figura 3. Escores de diarreia. Severidade da diarreia caracterizada de acordo com a consistência das fezes presentes na região perianal dos animais: 0 = fezes normais (ou ausência de diarreia); 1 = fezes semi-sólidas (ou aspecto úmido); 2 = pequena ou moderada quantidade de fezes pastosas; e 3 grande quantidade de fezes pastosas. **Fonte:** Autoria própria (05/2014).

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

A avaliação do *enteropooling* induzido por óleo de rícino foi realizado conforme o método descrito por Robert e colaboradores (1976) com algumas modificações. Os ratos, em jejum por 18 h antes dos experimentos, foram aleatoriamente alocados em cinco grupos. O grupo controle (grupo I) recebeu salina (2,5 ml/kg), enquanto os grupos II, III e IV receberam PLS (10, 30 e 90 mg/kg, respectivamente) e o grupo V recebeu loperamida (5 mg/kg). Todos os animais foram tratados por gavagem. Após 1 h do pré-tratamento, todos os ratos foram tratados com óleo de rícino (10 ml/kg, *v. o.*). Após 3 h da indução da diarreia, os ratos foram eutanasiados com sobredose de tiopental sódico (100 mg/kg; *i.p.*), laparatomizados e o intestino delgado, a partir do piloro ao ceco, foi isolado e removido da cavidade abdominal. A seguir, o

conteúdo intestinal foi mensurado em um tubo graduado. A atividade de cada tratamento foi expressa como porcentagem de inibição (%) do volume do fluido intestinal e foi calculado usando a seguinte expressão:

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

Onde: A representa a média do volume do fluido intestinal induzido pelo óleo de rícino; B representa a média do volume do fluido intestinal após o tratamento com a droga padrão utilizada ou com o PLS extraído da alga marinha *H. musciformis*.

5.5.3. Determinação da atividade da proteína Na⁺ K⁺ ATPase no intestino delgado

Inicialmente, o óleo de rícino foi usado para induzir diarreia como descrito anteriormente, seguindo o método descrito por Awouters e colaboradores (1978) com modificações. Antes dos experimentos, os camundongos foram submetidos a jejum de 18 h, mas com livre acesso a água e divididos aleatoriamente em 5 grupos. Os animais do grupo controle (grupo I) receberam salina (2,5 ml/kg, *v.o.*), enquanto os animais do grupo II receberam PLS (90 mg/kg, *v.o.*), o grupo III recebeu loperamida (5 mg/kg, *v.o.*) e o grupo IV recebeu apenas veículo. Após 1 h do pré-tratamento, o óleo de rícino (10 ml/kg, *v.o.*) foi administrado para os grupos experimentais (grupos I a III), enquanto o grupo IV recebeu apenas salina (2,5 ml/Kg, *v.o.*). Após 3 h, os camundongos foram eutanasiados, laparatomizados e o intestino delgado, a partir do piloro ao ceco, foi removido da cavidade abdominal para avaliar a atividade da proteína Na⁺ K⁺ ATPase presente nos enterócitos intestinais, usando o procedimento descrito por Bewaji e colaboradores (1985) com algumas modificações. As amostras dos três segmentos intestinais foram homogeneizadas em 400 µl de NaCl 200 mM, KCl 40 mM e tampão tris 60 mM (pH 7.4) para cada 40 mg de tecido. Alíquotas de 20 µl do homogenato intestinal foram misturadas a 20 µl de MgCl₂.6H₂O 80 mM, 20 µl de EGTA 20 mM e 240 µl de água destilada. Os tubos foram incubados 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. Após esse período de tempo, foi ainda acrescentado 200 µl de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS, 5%) juntamente com 2.000 µl de uma mistura de reagente de Splittgerber (solução de molibdato de amônio e ácido sulfúrico) com ácido ascórbico (9%) em proporção 4:1 v/v. A mistura foi depois incubada durante 30 minutos em 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 absorvância foi mensurada a 560 nm em espectrofotômetro. A concentração de fosfato inorgânico no tecido foi validada a partir de uma curva de calibração obtida com concentrações conhecidas de fosfato inorgânico. A atividade de Na⁺ K⁺ ATPase foi padronizada em termos de concentração de proteínas nas amostras de tecidos do intestino delgado, determinada seguindo os procedimentos padrões fornecidos pela Labtest Brasil. A leitura da absorvância foi mensurada a 545 nm, em duplicata, em um espectrofotômetro. A atividade específica de Na⁺ K⁺ ATPase foi calculada da seguinte forma:

Atividade específica (µmoles de Pi/mg de proteína/hr) = [Pi] x 2 x fator de diluição/1000 x concentração de proteína (mg/ml)

Onde: [Pi] representa a concentração de fosfato inorgânico em nmoles (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 µmoles.

5.5.4. Avaliação do trânsito intestinal

O efeito do PLS sobre o trânsito intestinal foi avaliado pelo método descrito por DiCarlo e colaboradores (1994) utilizando uma refeição de carvão como marcador da distância percorrida. Esse teste foi avaliado em três etapas, realizadas separadamente, visando analisar um possível envolvimento do sistema opioide ou uma atividade anticolinérgica no efeito do PLS sobre a motilidade intestinal. Na primeira série de experimentos o efeito do PLS na redução do trânsito intestinal foi avaliado no modelo de diarreia induzida por óleo de rícino. Os camundongos foram divididos aleatoriamente em 3 grupos. Os animais foram mantidos em jejum por 18 h antes do teste, mas com acesso a água *ad libitum*. Todos os animais receberam óleo de rícino (10 ml/kg, *v.o.*) para induzir diarreia e após 1 hora foram tratados oralmente com salina (grupo I), PLS (90 mg/kg; grupo II), ou loperamida (5 mg/kg; grupo III). Uma hora após a administração das drogas, todos os animais receberam por via oral uma refeição de carvão (0,2 ml/animal) contendo 10% de carvão ativado suspenso em 5% de goma arábica. Decorridos 20 minutos, os animais foram eutanasiados. Após a laparotomia, o intestino delgado foi exposto, rapidamente isolados por ligaduras nas junções gastro-duodenal, e íleo-cecal sendo finalmente removidos e estendidos em uma superfície limpa. A distância percorrida pelo carvão

(marcador) em relação ao comprimento total do intestino delgado foi mensurada e expressa como porcentagem da distância percorrida, onde:

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

Onde: A representa a média da distância percorrida pelo carvão; B representa a média do comprimento total do intestino.

Na segunda série de experimentos, para examinar um possível envolvimento do sistema opióide no efeito do PLS na redução do trânsito intestinal induzido por óleo de rícino, os camundongos foram tratados com naloxona (2 mg/kg, *s.c.*; antagonista opióide). Após trinta minutos, os camundongos foram tratados com salina (grupo IV), PLS (90 mg/kg; grupo V); ou loperamida (5 mg/kg; agonista opióide; grupo VI). Os passos seguintes foram realizados como descrito anteriormente.

Além disso, na terceira série de experimentos, para avaliar uma possível atividade anticolinérgica do PLS na redução do trânsito intestinal, foi usado o modelo do trânsito intestinal estimulado por betanecol, um agonista colinérgico de receptores muscarínicos do tipo 3 (MORAIS et al., 2012). Os camundongos foram aleatoriamente divididos em 4 grupos e pré-tratados por via oral com salina (2,5 ml/kg, *v.o.*; grupo VII), PLS (90 mg/kg, *v.o.*; grupo VIII), ou atropina (3 mg/kg, *s.c.*; antagonista colinérgico; grupo IX). Após 30 min, o grupo VIII a IX recebeu betanecol (3 mg/kg, *i.p.*). O grupo X recebeu apenas salina (controle veículo). Uma hora depois, todos os animais receberam por via oral uma refeição de carvão (0,2 ml/animal) contendo 10% de carvão ativado suspenso em 5% de goma arábica. Vinte minutos depois, os camundongos foram eutanasiados e a distância percorrida pelo carvão no intestino, a partir do piloro ao ceco, foi mensurada como descrito anteriormente.

5.5.5. Avaliação do esvaziamento gástrico

O esvaziamento gástrico foi aferido por meio da técnica de Reynell e Spray (1978) modificada. Após jejum de 20 horas, os camundongos do grupo controle foram tratados por via oral com salina (2,5 ml/kg; grupo I), enquanto o grupo teste foi tratado com PLS (90 mg/kg; Grupo II). Após 1 hora, os camundongos receberam por via oral, 300 µl de uma refeição teste que consistia de um marcador não absorvível (0,75 mg/ml de solução de vermelho de fenol em 5% de glicose). Decorridos 20 minutos, os animais foram eutanasiados. 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. Depois de sua retirada, o estômago e o intestino delgado foram colocados em uma mesa e divididos nos seguintes segmentos: estômago e intestino. Cada um desses segmentos foi introduzido em um cilindro graduado e o volume total foi aferido através da adição de 10 ml de NaOH a 0,1 N. A seguir, os segmentos foram homogeneizados por 30 s. Após 20 minutos da homogeneização, foi retirado 1 ml do sobrenadante e centrifugado por 10 minutos à 2800 rpm. As proteínas no homogeneizado foram precipitadas através da adição de ácido tricloroacético (20 %), e novamente centrifugadas por 20 min a 2800 rpm. A seguir, foram retirados 150 µl do sobrenadante e adicionados a 200 ml de NaOH a 0,5 N, juntamente com 600 µl de água destilada. A absorbância das amostras foi estabelecida em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 540 nm e expresso em densidade óptica (D.O.). A curva padrão foi obtida por espectrofotômetro a 540 nm de uma concentração conhecida de vermelho de fenol diluída em NaOH a 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 (x) foi expressa em % de acordo com a seguinte fórmula:

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

5.5.6. Enteropooling induzido por PGE₂

O *enteropooling* induzido por PGE₂ foi realizado de acordo com o método descrito por Murherjee e colaboradores (1998) com algumas modificações. Os ratos foram deixados em jejum de 18-24 horas antes dos experimentos. Os animais foram divididos em 4 grupos. O grupo I recebeu salina por via intraperitoneal (grupo I), enquanto o grupo II recebeu PLS (90 mg/kg) e o grupo III loperamida (5 mg/kg) por via oral. Imediatamente após a administração, todos os grupos foram administrados com PGE₂ (100 µg/kg), por via oral, para indução da diarreia, exceto para o grupo IV, o qual recebeu apenas salina (veículo controle). Após 30 minutos da administração de PGE₂, cada animal foi eutanasiado e o intestino delgado, a partir do piloro ao ceco foi isolado e retirado da cavidade abdominal. O conteúdo intestinal foi coletado em um tubo graduado e em seguida seu volume foi mensurado. A eficácia de cada tratamento foi

expressa como porcentagem de inibição (%) do volume do fluido intestinal e foi calculado como descrito anteriormente na seção 5.5.2.

5.5.7. Secreção de fluido intestinal induzida pela toxina da cólera em alças intestinais isoladas

O efeito do PLS sobre a secreção de fluido intestinal foi avaliado em alças intestinais isoladas, como descrito por Tradtrantip e colaboradores (2014). Os camundongos, em jejum por 24 horas, foram aleatoriamente divididos em 3 grupos e pré-tratados, por via oral, com salina (2,5 ml/kg) no grupo controle negativo (grupo I) e positivo (grupo II), enquanto o grupo teste (grupo III) recebeu PLS (90 mg/kg). Uma hora depois, os animais foram anestesiados com a associação de cloridrato de xilasina (5 mg/kg) e cloridrato de quetamina (60 mg/kg), injetados por via intraperitoneal. Em seguida, foi realizada uma laparotomia mediana de 1-2 cm, incidindo-se, em primeira instância, a pele e, em seguida, o peritônio, para a visualização do intestino delgado. Após exposição do intestino delgado, em porção de 2-3 cm do jejuno medial, foi feita uma dupla ligadura obstrutiva, para isolamento da alça. Posteriormente, foi injetado na alça isolada um volume de 100 µl de solução tampão fosfato-salina (PBS) (grupo I) ou toxina do cólera (TC) na dose de 1 µg/alça (grupo II e III). A seguir, as alças intestinais foram reposicionadas dentro da cavidade abdominal, a incisão cirúrgica foi suturada e os camundongos foram deixados recuperar da anestesia. Durante o procedimento, a temperatura do corpo foi mantida em torno de 36–38° C. Quatro horas após a anestesia, os camundongos foram eutanasiados, a cavidade abdominal (pele e peritônio) dos animais foi aberta e as alças isoladas foram cuidadosamente removidas da cavidade abdominal, de modo a evitar ruptura do tecido ou perda de líquido. O mesentério foi removido, o peso da alça determinado em miligramas e o comprimento em centímetros. A secreção de fluido intestinal foi calculada dividindo-se o peso da alça pelo seu comprimento. O fluido intestinal acumulado em cada alça isolada foi coletado para mensurar a concentração de íons cloreto (Cl⁻).

5.5.8. Determinação da concentração de íons cloreto no fluido intestinal

A concentração de Cl⁻ no fluido intestinal acumulado em cada alça isolada foi determinada por kit comercial Labtest® de acordo com as instruções recomendadas pelo fabricante. Resumidamente, as amostras de fluido coletadas foram centrifugadas a 4000 rpm

durante 10 minutos e o sobrenadante foi recolhido e diluído na proporção 1:2 com água destilada. As amostras foram misturadas com os reagentes do kit durante dois minutos e a absorbância foi medida a 470 nm em espectrofotômetro. Os valores obtidos foram expressos em mEq/L.

5.5.9. Avaliação da absorção intestinal em alças isoladas

Para estudar o efeito do PLS na absorção intestinal, foi seguido o método descrito por Tradtrantip e colaboradores (2014). Antes dos experimentos, os camundongos foram deixados em jejum de 24 horas com livre acesso a água. Alças intestinais foram isoladas como descrito na seção 5.5.7. Subsequentemente, nas alças foi injetado 200 µl of PBS (Grupo I, controle negativo), PBS contendo glicose 10 mM (Grupo II; controle positivo para a absorção intestinal), ou PBS contendo PLS (90 mg/kg; Grupo III). As alças intestinais foram reposicionadas dentro da cavidade abdominal, a incisão cirúrgica foi suturada, e os camundongos foram deixados recuperar da anestesia. Trinta minutos após a inoculação nas alças, os camundongos foram eutanasiados, a cavidade abdominal (pele e peritônio) foi reaberta e em seguida, as alças foram cuidadosamente removidas. O peso da alça intestinal isolada foi determinado em miligramas, como sendo a diferença entre o peso da alça antes e após a eliminação do conteúdo luminal. A porcentagem da absorção de fluido foi medida indiretamente a partir da relação peso/comprimento da alça intestinal isolada.

5.5.10. GM1-ELISA

A capacidade de ligação do PLS ao receptor GM1 foi analisada por meio da técnica de ELISA (GM1-ganglioside enzyme-linked immunosorbent assay/GM1-ELISA) como descrito anteriormente por Saha e colaboradores (2013). Uma solução (2 µg/ml) de monosialogangliosídeo-GM1 obtido a partir de cérebro bovino (100 µl em PBS, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) foi adicionada a microplacas de 96 poços (Global Plast, China) e incubadas *overnight* a temperatura ambiente. Locais de ligação extras foram bloqueados pela adição de 200 µl de BSA (1% p/v dissolvido em PBS, Albumina Sérica Bovina, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), e incubado durante 30 min a 37 °C. Após cada passo, as placas foram lavadas três vezes com PBS contendo 0,05% v/v de Tween 20 (etapa de lavagem). Amostras contendo 100 ng de TC (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), com e sem diferentes concentrações dos polissacarídeos

(1 a 500 ug/ml) foram diluídas em série, adicionadas às placas de microtitulação e incubadas à temperatura ambiente durante 2 h. Após a etapa de lavagem, 100 µl de um anticorpo apropriado diluído 1:2000 em PBS foram adicionados. Para o GM1-ELISA, os anticorpos utilizados foram 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 conjugada com uma peroxidase (GE Healthcare, Amersham Place, UK). As microplacas foram incubadas com TC e as soluções com anticorpos durante 1 hora, à temperatura ambiente, e deixadas em agitador durante a incubação. Após a etapa de lavagem, 100 µL de uma solução fresca de 3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina (TMB) foi adicionado aos poços, durante 15 min à temperatura ambiente. A intensidade de cor foi medida a 492 nm num leitor de ELISA (Bio-Rad). Cada experimento foi realizado em triplicata e validado contra uma curva padrão de concentrações conhecidas de TC (100 a 1,56 ng/ml) que foi utilizada para estimar a quantidade de TC nos poços. Para o controle negativo, os poços foram incubados sem GM1.

5.5.11. Análise estatística

Os dados são descritos como média \pm EPM de animais em cada grupo (n = 5-6). Os resultados obtidos nos animais do grupo controle tratados com solução salina foram utilizados como valores de referência. Os resultados obtidos a partir dos grupos tratados com PLS ou droga de referência foram comparados com aqueles obtidos a partir do grupo controle tratado com salina. Os dados referentes aos ensaios *in vitro* representam a média \pm EPM de três experimentos independentes realizados em triplicata. Todas as análises estatísticas foram realizadas no software Graphpad Prism (versão 5.0). Análise unidirecional da variância (ANOVA) e o teste Student-Newman-Keuls foram usados para determinar a significância estatística das diferenças entre os grupos e o teste não paramétrico Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn's foram utilizados para comparar a fluidez das fezes. $P < 0,05$ foi definido como estatisticamente significativo.

6. RESULTADOS

6. 1. Efeito do PLS sobre a diarreia induzida por óleo de rícino

A administração de óleo de rícino induziu significativa diarreia, com diminuição da consistência das fezes. Contudo, o pré-tratamento dos ratos com PLS nas doses testadas (10, 30 e 90 mg/kg), reduziu de forma significativa ($P < 0,05$) o número total de fezes ($22,25 \pm 0,008$ g; 46,68% de inibição; $26,93 \pm 0,007$ g; 35,46% de inibição; $17,10 \pm 0,008$ g; 59,02% de inibição, respectivamente) comparado ao grupo controle ($41,73 \pm 0,005$ g). Os resultados obtidos em nossos experimentos mostram que o PLS (10, 30 e 90 mg/Kg) também reduziu o número total de fezes diarreicas, portanto controlando a frequência da diarreia ($18,98 \pm 0,008$ g; 50,82% de inibição; $20,52 \pm 0,007$ g; 46,83% de inibição; $14,22 \pm 0,008$ g; 63,16% de inibição, respectivamente) quando comparado ao grupo controle (Tabela 1). Além disso, as três doses administradas diminuíram significativamente a severidade da diarreia, avaliada como escores, em comparação com o tratamento do grupo controle (Figura 4). Loperamida (5 mg/kg), a droga padrão antidiarreica, também reduziu significativamente ($P < 0,05$) o número total de fezes ($0,240 \pm 0,011$ g; 99,42% de inibição), o número total de fezes diarreicas ($0,240 \pm 0,011$ g; 99,37 % de inibição), e a severidade da diarreia quando comparado ao grupo controle.

Tabela 1
Efeito do PLS (10, 30, 90 mg/kg v.o.) na diarreia induzida por óleo de rícino em ratos.

Tratamento	Número total de fezes (g)	Inibição da defecação (%)	Número total de fezes diarreicas (g)	Inibição da diarreia (%)
Controle (2,5 ml/kg)	$41,730 \pm 0,005$	-	$38,600 \pm 0,005$	-
PLS (10 mg/kg)	$22,250 \pm 0,008^*$	46,681	$18,980 \pm 0,008^*$	50,829
PLS (30 mg/kg)	$26,930 \pm 0,007^*$	35,466	$20,520 \pm 0,007^*$	46,839
PLS (90 mg/kg)	$17,100 \pm 0,008^*$	59,022	$14,220 \pm 0,008^*$	63,160
Loperamida (5 mg/kg)	$0,240 \pm 0,011^*$	99,424	$0,240 \pm 0,011^*$	99,378

Os valores são apresentados como média \pm EPM. Número de animais por grupo = 5-6. * $P < 0,05$ vs. grupo controle, Anova e teste de Newman-Keuls.

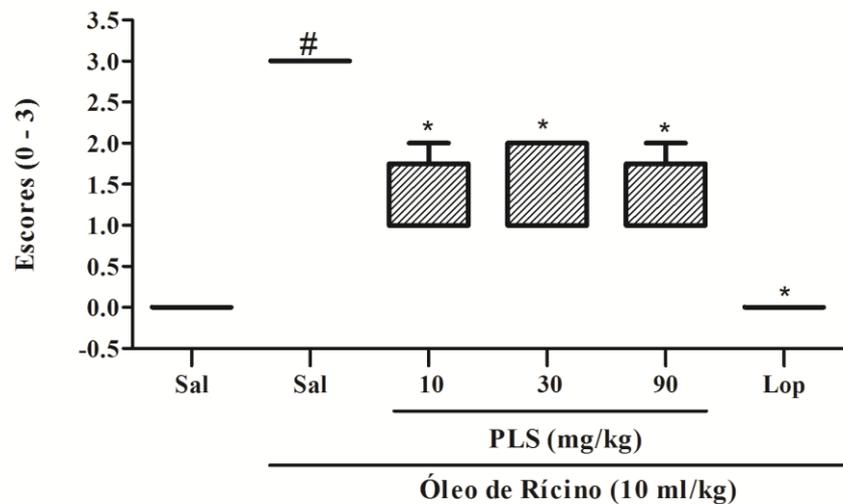


Figura 4. Efeito do PLS na diarreia induzida por óleo de rícino em ratos. Três horas após a administração do óleo de rícino, todos os ratos do grupo controle produziram grave diarreia. O PLS em todas as doses (10, 30 e 90 mg/kg, *v.o.*) testadas reduziu significativamente a severidade da diarreia, mensurada pelos escores numéricos, quando comparada com o tratamento controle. A droga antidiarreica padrão, loperamida (5 mg/kg, *v.o.*), reduziu a fluidez das fezes significativamente. Os dados são apresentados como a média \pm EPM de 5-6 animais por grupo. # $P < 0,05$ vs. grupo salina; * $P < 0,05$ vs. grupo controle. A análise estatística foi realizado utilizando Kruskal-Wallis seguido pelo teste Dunn. Abreviações: Lop: loperamida; PLS: polissacarídeo sulfatado extraído da alga marinha vermelha *H. musciformis*; Sal: salina.

6.2. O PLS reduz o acúmulo de fluido intestinal (*enteropooling*) induzido por óleo de rícino

A administração do PLS (90 mg/kg) diminuiu significativamente ($P < 0,05$) o volume do conteúdo intestinal induzido por óleo de rícino em ratos (43,31% de inibição), comparado ao grupo controle. Considerando que a dose de 90 mg/kg proporcionou o melhor efeito antidiarreico, a mesma foi selecionada como padrão para os experimentos seguintes. Loperamida, também reduziu significativamente ($P < 0,05$) o volume do fluido em 44,82%, quando comparada ao grupo controle (Tabela 2).

Tabela 2
Efeito do PLS (10, 30, 90 mg/kg *v.o.*) no *enteropooling* induzido por óleo de rícino em ratos.

Tratamento	Volume do fluido intestinal (ml)	Inibição do volume do fluido intestinal (ml) (%)
Controle (2,5 ml/kg)	2,175 \pm 0,184	-
PLS (10 mg/kg)	1,650 \pm 0,184	24,137
PLS (30 mg/kg)	1,725 \pm 0,085	20,689
PLS (90 mg/kg)	1,233 \pm 0,145*	43,310
Loperamida (5 mg/kg)	1,200 \pm 0,115*	44,827

Os valores são apresentados como média \pm EPM. Número de animais por grupo = 5-6. * $P < 0,05$ vs. grupo controle. ANOVA e teste de Newman-Keuls.

6.3. Efeito do PLS sobre a atividade da proteína Na⁺ K⁺ ATPase no intestino delgado

Os resultados mostram que o tratamento com óleo de rícino reduziu significativamente ($P < 0,05$; Figura 5) a atividade da proteína Na⁺ K⁺ ATPase ($432,00 \pm 54,57 \mu\text{mol/mg/h}$) comparado ao tratamento apenas com salina ($1158,00 \pm 154,00 \mu\text{mol/mg/h}$). Contudo, a atividade de Na⁺ K⁺ ATPase aumentou significativamente ($P < 0,05$) no intestino delgado dos animais pré-tratados com PLS ($1431,00 \pm 384,10 \mu\text{mol/mg/h}$) quando comparado ao grupo óleo do rícino. Os resultados sugerem que o tratamento com PLS é capaz de impedir a perda de Na⁺ e K⁺, enfatizando seu efeito antidiarreico.

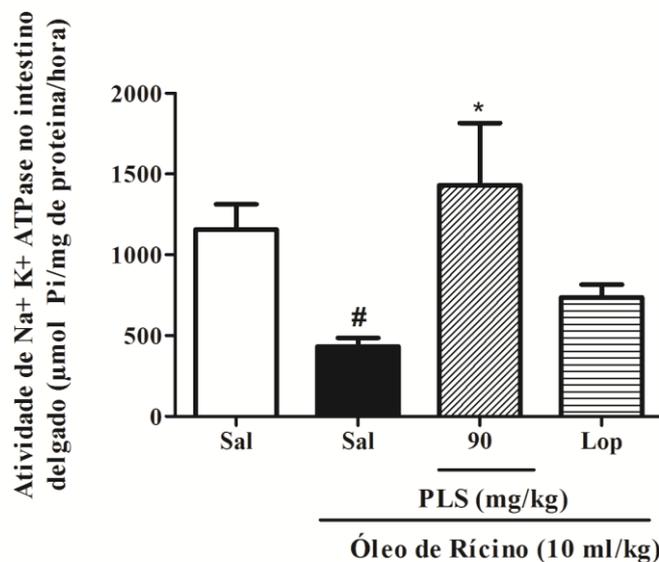


Figura 5. Efeito do PLS na atividade da proteína Na⁺ K⁺ ATPase no intestino dos camundongos, na diarreia induzida por óleo de rícino. O pré-tratamento com PLS (90 mg/kg, *v.o.*) aumentou a atividade de Na⁺ K⁺ ATPase significativamente ($P < 0,05$) quando comparado ao grupo óleo de rícino. Os dados são apresentados como a média \pm EPM de 5-6 animais por grupo. # $P < 0,05$ vs. grupo salina; * $P < 0,05$ vs. grupo salina + óleo de rícino. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA, seguido do teste de Newman-Keuls. Abreviações: Lop: loperamida; PLS: polissacarídeo sulfatado extraído da alga marinha vermelha *H. musciformis*; Sal: salina.

6.4. Participação de mecanismo opioide e colinérgico no efeito do PLS sobre a redução do trânsito intestinal

Os animais pré-tratados com PLS ou loperamida mostraram uma inibição significativa ($P < 0,01$) no trânsito intestinal de 53,725% e 38,700%, respectivamente, comparado ao grupo tratado com salina. Adicionalmente, na segunda série de experimentos, foi administrado um antagonista opioide não específico, naloxona, para verificar a possibilidade de envolvimento dos receptores opioides. O pré-tratamento com o antagonista opioide não alterou o efeito do

tratamento com PLS (52,884% de inibição), embora tenha alterado a atividade da loperamida (1,902% de inibição), a droga padrão utilizada para o tratamento da diarreia, uma vez que ela altera o trânsito intestinal por interagir com receptores opioides presentes no intestino (Figura 6). Estes resultados sugerem que a inibição do trânsito intestinal após o tratamento com PLS não é mediada pelos receptores opioides no intestino.

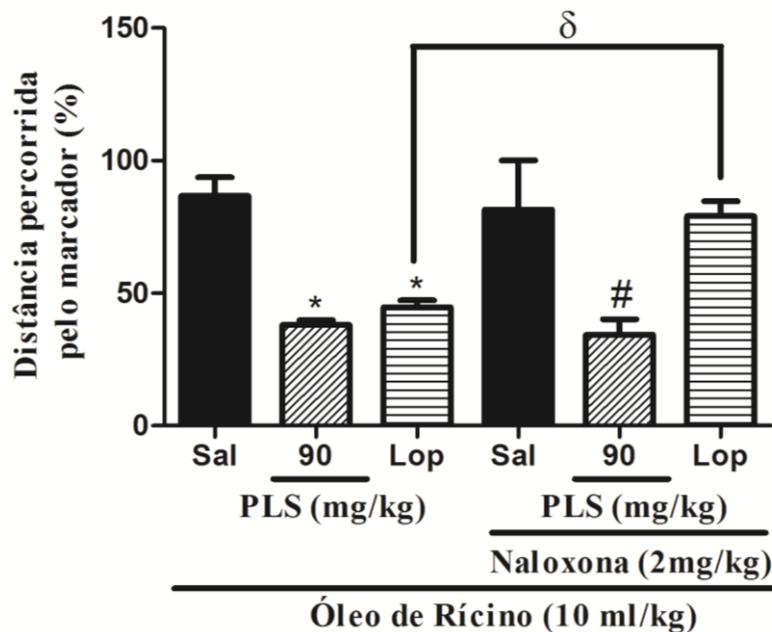


Figura 6. Naloxona não altera o efeito do PLS no trânsito intestinal em camundongos. Os animais receberam óleo de rícino para induzir diarreia. O tratamento com PLS (90 mg/kg, *v.o.*) reduziu significativamente ($P < 0,01$) o trânsito da refeição de carvão (marcador) no intestino delgado. Loperamida (5 mg/kg, *v.o.*), demonstrou um efeito comparável ao PLS. O pré-tratamento com naloxona (2 mg/kg, *s.c.*) no grupo tratado com PLS não reverteu seu efeito anti-motilidade. Os dados são apresentados como média \pm EPM de 5-6 animais por grupo. * $P < 0,01$ vs. grupo salina; # $P < 0,01$ vs. grupo salina + naloxona; $\delta P < 0,01$ quando comparados os grupos tratados com loperamida e loperamida + naloxona. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA, seguido do teste de Newman-Keuls. Abreviações: Lop: loperamida; PLS: polissacarídeo sulfatado extraído da alga marinha vermelha *H. musciformis*; Sal: salina.

No modelo de trânsito intestinal estimulado por betanecol, os resultados mostram que este agonista colinérgico aumentou significativamente ($P < 0,01$) a porcentagem da distância percorrida pelo carvão no intestino em comparação ao tratamento apenas com salina ($80,900 \pm 7,170\%$ vs. $52,830 \pm 3,187\%$, respectivamente). O pré-tratamento dos animais com PLS mostrou uma redução significativa ($P < 0,001$) do trânsito intestinal de 42,913%, quando comparado ao grupo tratado com salina. Além disso, a atropina, o antagonista colinérgico utilizado, foi capaz de diminuir significativamente ($P < 0,001$) a distância percorrida pelo marcador com inibição de 43,410% quando comparado ao grupo tratado com salina. Esses resultados mostram que o PLS reduziu o efeito estimulatório exercido pelo betanecol no trânsito

intestinal (Figura 7), sugerindo uma possível atividade anticolinérgica do PLS na redução do trânsito intestinal em camundongos.

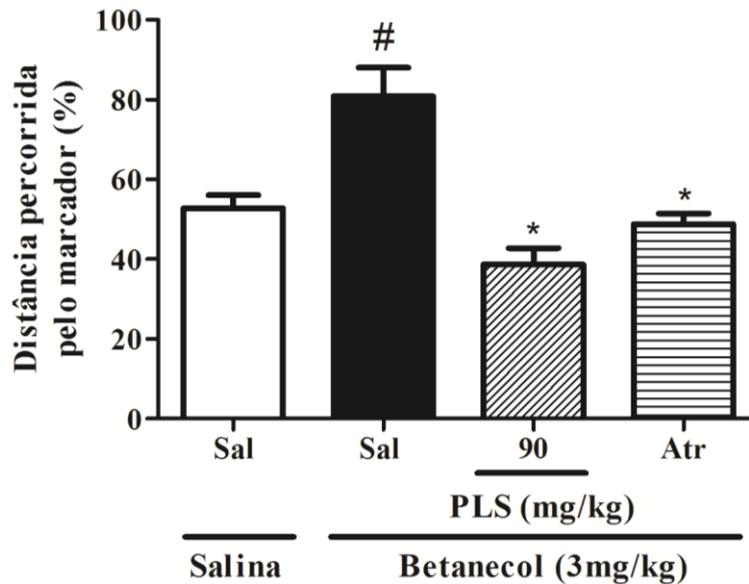


Figura 7. O PLS reduz o efeito estimulatório do betanecol no trânsito intestinal em camundongos. Betanecol (3 mg/kg, *i.p.*), o agonista colinérgico, aumentou significativamente ($P < 0,01$) a porcentagem da distância percorrida pela refeição de carvão no intestino comparada ao tratamento apenas com salina. O pré-tratamento com PLS (90 mg/kg, *v.o.*) reduziu significativamente ($P < 0,001$) o movimento propulsivo e o trânsito do marcador no intestino delgado. Atropina (3 mg/kg, *s.c.*) demonstrou um efeito comparável ao PLS. Os dados são apresentados como a média \pm EPM de 5-6 animais por grupo. * $P < 0,001$ vs. grupo salina + betanecol; # $P < 0,01$ vs. apenas salina. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA, seguido do teste de Newman-Keuls. Abreviações: Atr: atropina; PLS: polissacarídeo sulfatado extraído da alga marinha vermelha *H. musciformis*; Sal: salina.

6.5. Efeito do PLS no esvaziamento gástrico

A Figura 8 mostra o efeito do tratamento com PLS na retenção gástrica em camundongos. Foi observado que no estômago dos animais pré-tratados com PLS não houve alteração da retenção gástrica ($30,530 \pm 4,141$ %) de forma significativa ($P < 0,05$), quando comparado ao grupo controle normal tratado apenas com salina ($35,280 \pm 6,560$ %). Os resultados sugerem que o efeito inibitório do PLS no trânsito intestinal dar-se provavelmente apenas em nível de intestino.

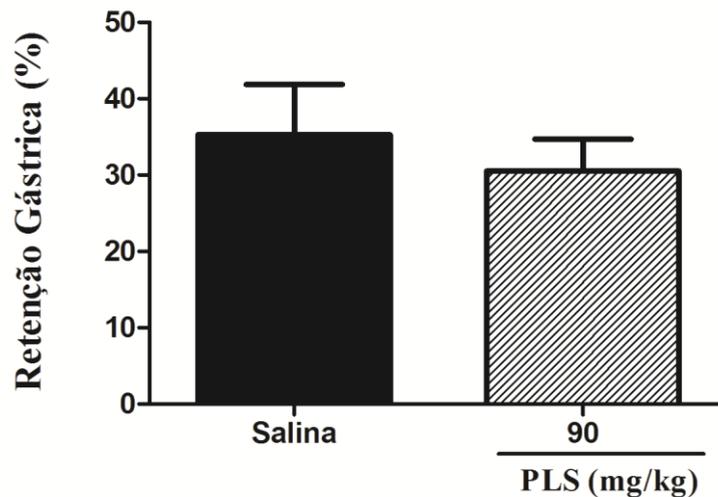


Figura 8. O PLS não acelera o esvaziamento gástrico em camundongos. No estômago dos animais pré-tratados com PLS não houve alteração da retenção de forma significativa ($P < 0,05$), quando comparado ao grupo controle normal tratado apenas com salina. Os dados são apresentados como a média \pm EPM de 5-6 animais por grupo. A análise estatística foi realizada utilizando teste t de Student. Abreviações: PLS: polissacarídeo sulfatado extraído da alga marinha vermelha *H. musciformis*.

6.6. Efeito do PLS sobre o *enteropooling* intestinal induzido por PGE₂

A administração de PGE₂ aumentou significativamente ($P < 0,001$) o volume do fluido intestinal comparado ao tratamento apenas com salina ($1,825 \pm 0,193$ ml vs. $0,420 \pm 0,165$ ml, respectivamente). Contudo, o grupo pré-tratado com PLS, comparado ao grupo tratado com PGE₂, demonstrou uma média de volume do fluido intestinal de $0,900 \pm 0,230$ ml, representando uma inibição de 50,684% e resultados semelhantes foram demonstrados pelo grupo tratado com loperamida ($0,960 \pm 0,040$ ml de volume do fluido intestinal e 47,397% de inibição). Esta inibição foi estatisticamente significativa ($P < 0,05$; tabela 3). Os resultados indicam que o tratamento com PLS foi capaz de reduzir o *enteropooling* induzido por PGE₂, sugerindo que o PLS é eficaz na diarreia inflamatória.

Tabela 3

Efeito do PLS (90 mg/kg v.o.) no *enteropooling* induzido por PGE₂ em ratos.

Tratamento	Volume do fluido intestinal (ml)	Inibição do volume do fluido intestinal (ml) (%)
Salina (2.5 ml/kg)	$0,420 \pm 0,165$	-
Controle (PGE ₂ em salina)	$1,825 \pm 0,193^{\#}$	-
PLS (90 mg/kg)	$0,900 \pm 0,230^*$	50,684
Loperamida (5 mg/kg)	$0,960 \pm 0,040^{**}$	47,397

Valores são apresentados como média \pm EPM. Número de animais por grupo = 5-6. $^{\#}P < 0,001$ vs. salina; $^*P < 0,05$ vs. PGE₂ em salina. $^{**}P < 0,01$ vs. PGE₂ em salina. ANOVA e teste de Newman-Keuls.

6.7. Eficácia do PLS na secreção de fluido induzida pela toxina da cólera em alças intestinais isoladas

Como mostra na figura 9A-B, houve um acúmulo do fluido intestinal (proporção peso/comprimento da alça) significativa ($P < 0,001$) e consequente distensão das alças injetadas com TC ($0,147 \pm 0,016$ g/cm) no grupo controle positivo, comparado ao grupo controle negativo onde as alças foram injetadas com PBS ($0,058 \pm 0,007$ g/cm). Contudo, o pré-tratamento com PLS produziu redução significativa ($P < 0,001$) do acúmulo do fluido intraluminal induzido pela TC ($0,069 \pm 0,012$ g/cm; 53% de inibição) comparado ao grupo controle positivo. Assim, o PLS foi efetivo em reduzir a secreção de fluido, diminuindo significativamente a atividade biológica da TC no intestino delgado.

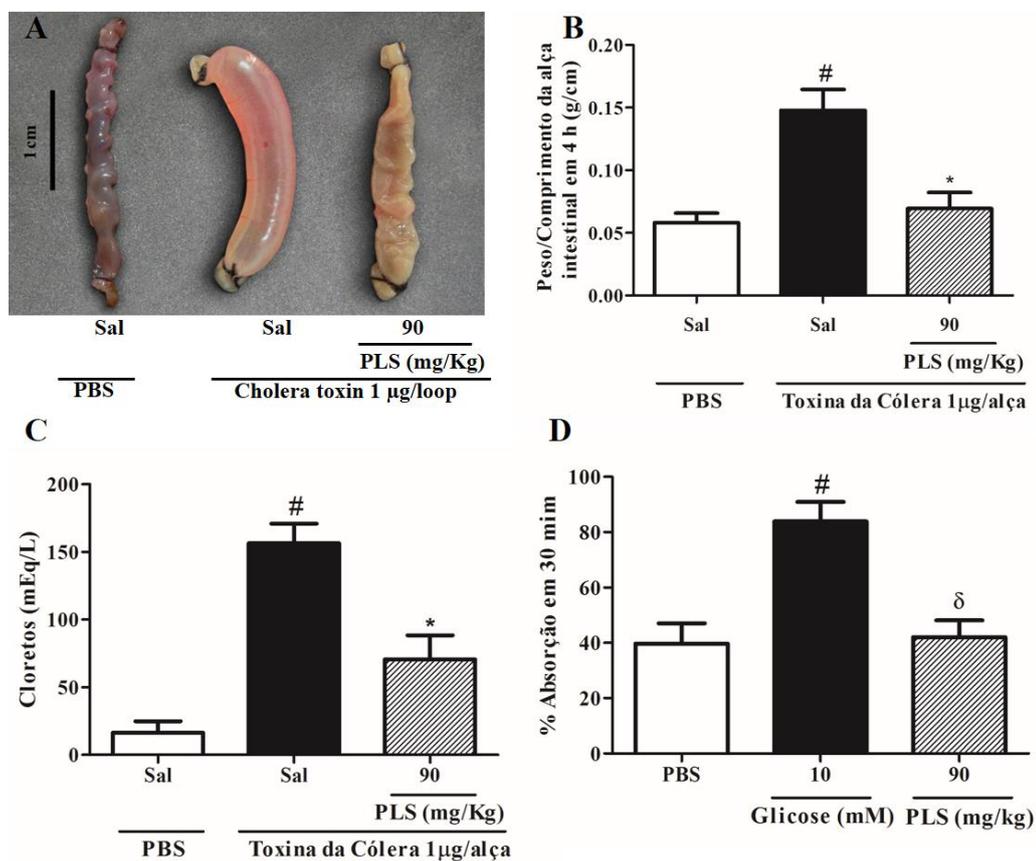


Figura 9. O PLS inibe a secreção de fluido intestinal induzida pela TC em de alças isoladas. A. O pré-tratamento com PLS (90 mg/kg. *v.o.*) reduziu significativamente ($P < 0,001$) o acúmulo da secreção de fluido após inoculação de TC ($1\mu\text{g}/\text{alça}$) dentro das alças intestinais. B. Secreção de fluido intestinal mensurada indiretamente como a proporção peso/comprimento das alças (g/cm). C. A concentração de íons cloreto reduziu significativamente ($P < 0,001$) no conteúdo intestinal dos animais pré-tratados com PLS. D. O PLS não afetou significativamente a absorção intestinal mostrada indiretamente como a proporção peso/comprimento das alças intestinais, em 30 minutos após injeção do PLS. Os dados são apresentados como a média \pm EPM de 5-6 animais por grupo. # $P < 0,001$ vs. grupo PBS; * $P < 0,001$ vs. grupo TC; $\delta P < 0,001$ vs. grupo glicose. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA, seguido do teste de Newman-Keuls. Abreviações: PBS: solução tampão fosfato salina; PLS: polissacarídeo sulfatado extraído da alga marinha vermelha *H. musciformis*; Sal: salina.

6.8. Efeito do PLS sobre a concentração de íons cloreto na secreção de fluido induzida pela toxina da cólera em alças intestinais isoladas

A concentração de íons cloreto foi significativamente ($P < 0,001$) alta nas alças intestinais injetadas com TC ($156,5 \pm 14,51$ mEq/L) comparado as alças injetadas apenas com PBS ($16,44 \pm 8,52$ mEq/L). Os níveis de cloreto foram reduzidos significativamente ($P < 0,001$) com a administração do PLS ($70,63 \pm 17,82$ mEq/L), como mostra a figura 9C. Os dados sugerem que o PLS reduz o grande efluxo desses íons para o lúmen intestinal na severa diarreia da cólera.

6.9. Eficácia do PLS na absorção intestinal

A figura 9D mostra a absorção intestinal no grupo controle positivo para este modelo, PBS contendo 10 mM de glicose ($83,90 \pm 7,04\%$), comparado ao grupo controle negativo ($39,67 \pm 7,34\%$). A injeção intraluminal do PLS nas alças isoladas não demonstrou efeito significativo na absorção intestinal ($42,00 \pm 6,15\%$), indicando diferença significativa em relação ao grupo tratado com glicose. Os resultados sugerem que a redução da secreção do fluido intestinal, estimulada pela TC, após o tratamento com PLS pode ser mediada por outro mecanismo.

6.10. O PLS interage com o receptor GM1 impedindo a ligação da toxina da cólera

Foi observado redução significativa ($P < 0,001$) da ligação da TC ao receptor GM1 na presença do PLS (100 $\mu\text{g/ml}$; pré-incubação) (Figura 10, coluna b). Achados similares foram obtidos com PLS em concentrações crescentes (1-500 $\mu\text{g/ml}$) adicionadas junto com TC nas microplacas adsorvidas com GM1 (Figura 10, coluna c a h). Os resultados mostram que os níveis de TC reduziram significativamente ($P < 0,001$) com todas as concentrações do PLS, de forma que a taxa de detecção da TC nos poços com 500 $\mu\text{g/ml}$ de PLS foi de $11,74 \pm 2,78\%$. Portanto, esses achados sugerem que o PLS interage com o receptor GM1, prevenindo a ligação de TC ao receptor GM1.

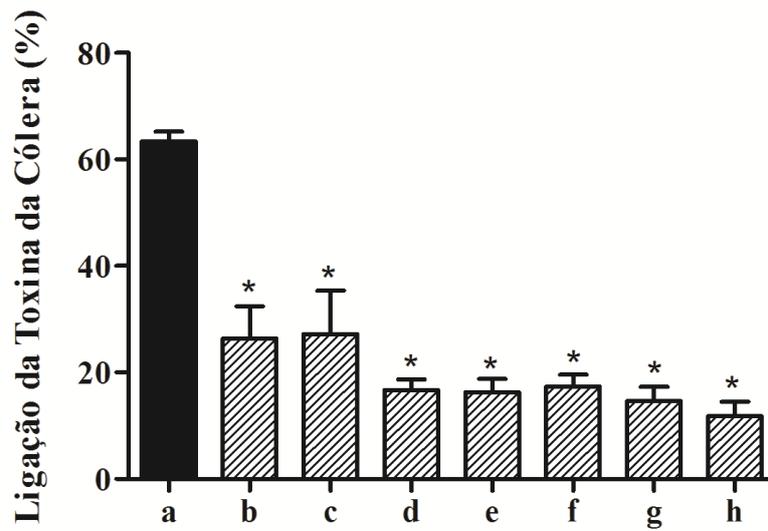


Figura 10. Efeito do PLS na ligação de TC ao receptor GM1. TC (100 ng) foi incubada sozinha (coluna a) ou com 1, 10, 50, 100, 300, ou 500 mg/ml de PLS (coluna c-h, respectivamente), e a quantidade de TC foi estimada por GM1 ELISA. Poços adsorvidos com GM1 e pré-incubados com PLS foram lavados e em seguida 100 ng de TC foram adicionados (coluna b). A seguir, a quantidade de ligação de TC foi estimada por ELISA (coluna b). Valores obtidos para 100 ng de TC foram tomados como 100% de ligação. Os dados são apresentados como a média \pm EPM a partir de três experimentos independentes realizados em triplicata dentro de condições similares. * $P < 0,001$ vs. coluna a.

7. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstra claramente que o PLS extraído a partir da alga marinha vermelha *H. musciformis* apresenta atividade antidiarreica em roedores, como evidenciado em modelos experimentais de diarreia aguda induzida com óleo de rícino e PGE₂ em ratos, bem como no trânsito intestinal e no modelo de diarreia secretória induzida pela TC em camundongos, mostrando sua eficácia sobre mecanismos fisiopatológicos relacionados as doenças diarreicas.

Inicialmente, para determinar o efeito antidiarreico do PLS foi utilizado o modelo de diarreia induzida por óleo de rícino. É bem descrito na literatura que o óleo de rícino é um laxante efetivo largamente utilizado no estudo dos sintomas associados com diarreia, uma vez que reduz a absorção, aumenta a secreção de água e eletrólitos, bem como estimula a contratilidade da musculatura lisa do intestino, acelerando o trânsito intestinal. Uma das vantagens deste modelo é a grande reprodutibilidade de evacuações de fezes líquidas formadas três hora após a administração do agente laxante (MASCOLO et al., 1993; PINTO et al., 1989). O óleo de rícino quando ingerido é hidrolisado pelas lipases pancreáticas a glicerol e ácido ricinoleico, sendo este último o responsável pelo efeito diarreico atribuído ao óleo (TUNARU et al., 2012).

A presença deste metabolito ativo no intestino delgado induz diarreia envolvendo vários mecanismos. O óleo de rícino induz a síntese a liberação de PGE₂, PAF e NO, o que resulta na secreção de eletrólitos no lúmen intestinal associado com estimulação da motilidade do músculo liso (MASCOLO et al., 1994; MASCOLO et al., 1993; IZZO et al., 1993; PINTO et al., 1989; LUDERER et al., 1980; AWOUTERS et al., 1978). O óleo de rícino aumenta a secreção de fluido intestinal envolvendo a participação da via AC com consequente aumento de AMPc. Existem evidências do envolvimento de taquicininas (por meio da ativação dos receptores NK1 e NK2), na diarreia induzida por esse agente, ao contribuir com o aumento da permeabilidade e aumento da contratilidade intestinal (CROCI et al., 1997). Portanto, vários fatores estão envolvidos na diarreia induzida por óleo de rícino e provavelmente compostos químicos, que produzem um efeito inverso a diarreia induzida por esse agente são capazes de inibir a biossíntese destes fatores ou mediadores.

Os resultados obtidos nesse trabalho demonstram que o PLS nas três doses testadas reduziu significativamente a severidade da diarreia induzida por óleo de rícino, o número total de fezes sólidas e o número total de fezes diarreicas, inibindo a defecação, bem como a diarreia.

Este efeito sugere que o PLS pode inibir alguns mediadores e/ou fatores envolvidos no mecanismo de ação do óleo de rícino, que envolve mudanças na motilidade intestinal, aumento da permeabilidade das células da mucosa e mudanças no transporte de eletrólitos.

Outro importante fator envolvido no processo diarreico é o acúmulo de fluido intestinal, o qual foi estudado utilizando o teste de *enteropooling* na diarreia induzida por óleo de rícino. O PLS reduziu significativamente o volume do conteúdo intestinal comparado ao tratamento controle. A redução do acúmulo do fluido intestinal pelo PLS pode ser devido a promoção de algum mecanismo antissecretório associado com o transporte de água e eletrólitos através da mucosa intestinal. Este resultado foi mais eficaz do que os dados reportados em outros estudos realizados anteriormente após a administração de produtos naturais oriundos de plantas, como o extrato da folha de *Desmodium pulchellum* (RAHMAN et al., 2013), o extrato etanólico extraído das raízes de *Aconitum heterophyllum* (PRASAD et al., 2014) e o polissacarídeo extraído de *Anacardium occidentale* (ARAÚJO et al., 2015), no mesmo modelo experimental.

O óleo de rícino é um irritante local, levando portanto a alterações na integridade das células epiteliais, que envolve mudanças na permeabilidade intestinal (MASCOLO et al., 1993). Dessa forma, este laxante pode induzir resposta secretória pela redução da atividade da proteína transmembranar $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}$ presente nos enterócitos do intestino delgado e no cólon, reduzindo a absorção de Na^+ e K^+ (GANGINELLA e PHILLIPS, 1975). A atividade dessa proteína para o transporte dos íons Na^+ e K^+ , contra o gradiente de concentração, exige como fonte de energia a hidrólise de uma molécula de ATP em ADP e fosfato inorgânico (ESMANN, FEDOSOVA e OLESEN, 2015; FIELD, 2003). A proteína possui três sítios de ligação de Na^+ e quando esse íon encontra-se ligado abre-se um sítio ativo de ligação de ATP. A partir de então, o ATP sofre hidrólise e isso gera energia para que a bomba faça um mecanismo muito parecido com um movimento de catraca, bombeando três íons Na^+ para o meio extracelular (ZEMELMAN, WALKER e CHU, 1992). Por conseguinte, os sítios de ligação de K^+ assumem uma alta afinidade a este íon e com isso duas moléculas de K^+ se ligam e o fosfato que ali estava se dissocia fazendo com que a bomba volte a sua forma original (PRESSLEY et al., 1996). Em condições diarreicas, como por exemplo ocasionadas pelo óleo de rícino, a redução da atividade desta proteína transmembranar favorece a redução da absorção de Na^+ e K^+ , com consequente acúmulo desses eletrólitos e água no lúmen intestinal, uma vez que o sódio é uma molécula higroscópica (RACHMILEWITZ, KARMELI e OKON, 1980; GANGINELLA e PHILLIPS, 1975).

Dessa maneira, no presente estudo foi analisada a atividade de Na⁺ K⁺ ATPase no sobrenadante do intestino delgado medida como a liberação de fosfato inorgânico a partir da hidrólise de ATP na presença de cátions apropriados. Os resultados obtidos no estudo mostram um notável aumento da atividade de Na⁺ K⁺ ATPase no intestino delgado dos camundongos pré-tratados com PLS. Alguns estudos mostram que substâncias ricas em hidrocarbonetos (glicocorticoides) aumentam a atividade de Na⁺ K⁺ ATPase, sugerindo a existência de um mecanismo citoprotetor na mucosa intestinal (ZEMELMAN, WALKER e CHU, 1992), o que pode vir a ser uma das possíveis formas de atuação do PLS. O aumento da atividade de Na⁺ K⁺ ATPase proporcionado após a administração do PLS corrobora os parâmetros de redução do acúmulo do fluido intestinal observados no teste de *enteropooling*.

Para estabelecer os efeitos do PLS na motilidade intestinal, foram realizados experimentos para verificar sua influência no trânsito intestinal de camundongos, usando carvão ativado como o marcador da distância máxima percorrida no intestino. Os resultados mostram que o PLS inibiu significativamente o trânsito intestinal no modelo de diarreia induzida por óleo de rícino, reduzindo a relação entre a distância percorrida pelo carvão e o comprimento total do intestino delgado, sugerindo assim que o mecanismo de ação antidiarreico do PLS pode envolver a redução na motilidade intestinal. Esses resultados são importantes no controle da diarreia, uma vez que esse efeito contribui com a redução no número de evacuações, favorece a absorção e água e eletrólitos, devido ao atraso na passagem do conteúdo intestinal, além de aumentar a viscosidade do bolo fecal (ADEYEMI e AKINDELE, 2008).

O efeito antidiarreico do PLS no modelo de trânsito intestinal foi próximo ao produzido pela loperamida, a droga de referência utilizada no estudo, que atua como um potente agonista dos receptores μ -opioides presentes no intestino. O efeito terapêutico da loperamida deve-se a redução da propulsão intestinal, inibição da secreção e fluido, resultando no aumento do tempo do trânsito intestinal e no aumento da absorção de fluídos e eletrólitos (LI e VAZIRI, 2012; TANGPU e YADAV, 2004). Sabendo-se que o controle da excitabilidade do músculo liso do trato gastrointestinal pode ser modulado por agentes farmacológicos como os opioides, decidiu-se investigar inicialmente se a atividade antidiarreica do PLS estava associada com os receptores opioides presentes no intestino. Nesse contexto, foi realizada a modulação do trânsito com naloxona, um antagonista puro dos receptores opioides, de modo a comprovar tal efeito. Foi observado que a naloxona significativamente reduziu o efeito da loperamida. Contudo, a naloxona não foi capaz de antagonizar significativamente o efeito exercido pelo PLS, indicando que sua atividade antidiarreica não depende de mecanismo opioide na redução do trânsito

intestinal. Esse resultado pode ser considerado vantajoso, uma vez que exclui os efeitos colaterais atribuídos aos opioides, os quais são fonte de preocupação entre os usuários, limitando, com frequência, seu uso. Entre os efeitos colaterais proporcionados pelo uso da loperamida pode-se incluir dor abdominal, distensão, inchaço, náuseas, vômito e constipação. (LI e VAZIRI, 2012).

Partindo da suposição que o trânsito intestinal pode ser retardado por inibição da liberação de acetilcolina e de neurotransmissores não adrenérgicos e não colinérgicos dos nervos entéricos (WOOD e GALLIGAN, 2004), foi investigado, a seguir, o possível efeito anticolinérgico do PLS na redução do trânsito intestinal induzido por betanecol. Estudos farmacológicos com antagonistas seletivos dos receptores muscarínicos têm indicado que o betanecol é um agonista colinomimético, que estimula a contratilidade do músculo intestinal ativando receptores muscarínicos do tipo 3 (M3) ao longo do trato gastrointestinal (INCE, TURKMEN e YAVUZ, 2011).

Nesse estudo, o PLS reduziu significativamente o efeito estimulatório do betanecol, sugerindo que sua atividade inibitória sobre a motilidade intestinal possivelmente está relacionada com mecanismos anticolinérgicos, farmacologicamente atuando como um antagonista dos receptores muscarínicos. Esta ação foi similar àquela desempenhada pela atropina, o antagonista colinérgico usado como droga de referência. Alguns estudos têm explorado a ligação de glicosaminoglicanos sulfatados ou não sulfatados a receptores muscarínicos do tipo M3. Há evidências para a atuação antagonista de glicosaminoglicanos sobre os receptores M3 em vários tecidos, incluindo pulmão, bexiga, coração e pâncreas (KARAKIULAKIS e ROTH, 2012). De acordo com Nathanson (2008), receptores colinérgicos muscarínicos possuem em sua estrutura resíduos de N-glicosilação em suas regiões transmembranares, podendo facilitar a interação com algumas substâncias que tenha átomos de carbono e hidrogênio em sua estrutura.

É importante notar que o teste de trânsito intestinal é um indicador da distância máxima percorrida pelo marcador ao longo do intestino delgado. Assim, esse método não fornece informações a respeito da quantidade do marcador que pode ser encontrada em cada seguimento do intestino delgado ou ao longo do trato gastrointestinal. Além disso, não faz distinção entre um efeito de esvaziamento no estômago ou um efeito relacionado a alteração no trânsito intestinal. Então, para avaliar se a atividade inibitória do PLS no modelo de trânsito intestinal poderia envolver a participação do estômago, foi realizado o ensaio de esvaziamento gástrico.

A determinação do esvaziamento gástrico, com base na retenção fracional do corante vermelho de fenol, tem sido amplamente utilizado e permite avaliar a motilidade gástrica e intestinal separadamente (SANTOS et al., 2007; GONDIM et al., 2001). Dessa forma, os resultados obtidos a partir dessa análise demonstram que o PLS não possui efeito sobre a retenção gástrica de líquidos em camundongos. Assim, pode-se inferir que o PLS não possui efeito procinético na motilidade gástrica, sugerindo ação na motilidade apenas a nível intestinal.

A diarreia induzida por PGE₂ foi outro modelo utilizado para avaliar a atividade antidiarreica do PLS e difere de outros modelos, uma vez que envolve inflamação aguda (MURHERJEE et al., 1998). PGE₂ é um mediador pró-inflamatório, produto do metabolismo da cicloxigenase (COX), que desempenha um papel significativo na fisiopatologia da diarreia no sistema digestivo (BOTELLA et al., 1955). O efeito diarreico associado com PGE₂ pode ser atribuído a fosforilação de canais iônicos, como o CFTR, com consequente secreção de Cl⁻ para o lúmen intestinal. O acúmulo de cloretos gera um gradiente eletroquímico que favorece a atração de sódio e água para o lúmen (MOON et al., 2015; FU, CHEN e XIANG, 2013; AWOUTERS et al., 1978). Além disso, a PGE₂ pode também atuar afetando a motilidade intestinal a partir da interação com receptores EP3 presentes no músculo liso intestinal, uma vez que tal receptor induz ações relacionadas a propulsão intestinal, constituindo um importante alvo para efeitos laxativos (SHAHBAZIAN et al., 2002). Assim, a PGE₂ é conhecida por causar diarreia em animais experimentais e em humanos (BEUBLER e JUAN, 1979).

No presente estudo, o PLS inibiu significativamente o acúmulo do fluido intestinal induzido por PGE₂. A redução dos efeitos diarreicos promovidos por esse mediador pode estar relacionada ao bloqueio de receptores de prostaglandina no trato gastrointestinal pelo PLS, bem como mecanismo citoprotetor, o que impediria a ligação PGE₂-receptor EP. De fato, a literatura relata que a utilização de polissacarídeos extraídos de algas como agentes anti-inflamatórios é vantajosa (CHAVES et al., 2012). Estudos realizados por nosso grupo de pesquisa demonstraram que o PLS possui notável atividade anti-inflamatória no processo de edema de pata, tornando as características de sinais flogísticos menos intensos (BRITO et al., 2013). Contudo o papel do PLS na redução da inflamação mediada diretamente por PGE₂ ainda não foi observado, sendo necessário mais estudos a fim de investigar essa possível interação. O efeito do PLS na inibição do *enteropooling* induzido por PGE₂ pode relacionar-se com a ação antidiarreica sobre o modelo de indução com óleo de rícino, uma vez que é comprovado o envolvimento de PGE₂ no seu mecanismo diarreico.

Além disso, foi utilizado o modelo de diarreia induzida pela TC para investigar uma possível atividade antissecretória intestinal do PLS. Em muitos países em desenvolvimento, a cólera é uma importante causa de morbidade e mortalidade, representando um grande problema de saúde pública (SAWASVIROJWONG et al., 2013). Os principais sintomas clínicos da cólera são principalmente induzidos pela toxina liberada pela bactéria *V. cholerae* no intestino delgado do hospedeiro (KAPER, MORRIS e LEVINE, 1995). A TC tornou-se uma ferramenta bastante utilizada para elucidar mecanismos patológicos de transporte de íons, bem como dos aspectos da fisiologia celular por meio dos receptores de membrana celular, abrindo muitas perspectivas para futuras aplicações terapêuticas e biotecnológicas (PETRI et al., 2008; FLACH et al., 2007; MOURAD, 2004).

A TC é uma proteína dimérica, composta por uma subunidade A associada a cinco subunidades B. A subunidade A é composta por dois polipeptídeos, A1 e A2, onde a subunidade A1 contém a atividade tóxica. As subunidade B se ligam firmemente a um receptor gangliosídeo específico, o GM1. Este está presente de forma abundante na borda ciliada das células epiteliais (POPOFF e POULAIN, 2010; TINKER, ERBE e HOLMES, 2005; LENCER, 2004). Após a ligação do pentâmero B ao receptor GM1, a toxina é internalizada nas células intestinais, via endocitose mediada pelo próprio receptor GM1 (LU et al., 2005). TC segue por transporte retrógrado do complexo de golgi até o retículo endoplasmático, onde TCA é clivada, e o componente A1 é secretado no citoplasma e induz uma cascata de sinalização, enquanto que a subunidade A2 e a subunidade B permanecem no retículo endoplasmático. A1 promove a ativação da AC e por conseguinte são produzidas quantidades cada vez maiores de AMPc nas células epiteliais intestinais, promovendo a abertura do canal de Cl^- na membrana celular, o que resulta no grande efluxo desse íons no lúmen intestinal. Além disso, água, Na^+ , K^+ , HCO_3^- e outros eletrólitos são perdidos devido ao gradiente osmótico e elétrico causado pela perda de Cl^- (Figura 2) (MANDAL, MANDAL e PAL, 2011; BROECK, HORVATH e WOLF, 2007; O' NEAL et al., 2005; PINA e JOHANNES, 2005). O volume secretado excede o capacidade de absorção normal do intestino e dessa forma, ocorre a severa diarreia com desidratação, que é característica da cólera.

Neste estudo, foi demonstrado que o PLS apresentou um efeito inibitório sobre a secreção de fluido intestinal induzida pela TC em alças intestinais isoladas, além de reduzir a concentração de Cl^- no lúmen intestinal. Portanto, esses dados sugerem que o PLS pode ter uma potencial aplicação no tratamento da cólera. Diante disso, foi investigado o possível mecanismo de ação que poderia estar envolvido com esse processo. Inicialmente foi investigado o

envolvimento do PLS sobre o processo normal de absorção intestinal. Contudo, não houve interferência sobre esse parâmetro, sugerindo que sua atuação pode ocorrer por meio de outro mecanismo para interferir na fisiopatologia da doença.

Embora a diarreia induzida pela TC, tenha sido tradicionalmente classificada como não-inflamatória, há estudos que apontam componentes inflamatórios nessa patogênese. A TC promove a ativação da fosfolipase C, a qual catalisa a hidrólise de fosfolípidos de membrana, com consequente liberação do ácido araquidônico, resultando no aumento da síntese de mediadores inflamatórios, como PGE₂, PGF₂ alfa e leucotrienos (PETERSON et al., 1994; PETERSON et al., 1991). Além disso, a serotonina (5-HT) tem sido considerada um importante mediador da secreção intestinal induzida pela TC. Nesse contexto, em estudos realizados por Beubler e Horina (1990), a TC pode desencadear a liberação de 5-HT por células enterocromafins, e por conseguinte, 5-HT causa a formação de PGE₂ via receptores 5-HT₂, levando a abundante secreção de fluido. Assim, PGE₂ é um fator importante no processo secretor, levando à perda de água e eletrólitos durante a cólera. Isso explica a eficácia de vários fármacos inibidores da síntese de prostaglandinas na redução do acúmulo de líquido mediado pela TC (PETERSON e OCHOA, 1989), o que corrobora com os resultados do presente estudo, uma vez que o PLS inibiu o *enteropooling* induzido por PGE₂. Contudo, mais estudos são necessários para confirmar essa correlação.

Atualmente, não há tratamento específico contra a diarreia induzida por toxinas bacterianas. A terapia com drogas antimicrobianas é limitada, porque não inibem diretamente a disseminação da TC e ainda contribuem para aumentar a resistência bacteriana (RIVERA et al., 2013). Embora a SRO possa efetivamente ajudar na recuperação da desidratação e perda de eletrólitos, sua combinação com agentes farmacológicos que possam inativar a TC seria algo imensamente vantajoso. Uma vez que a ligação da TC ao receptor GM1 é o primeiro passo para a translocação da toxina dentro das células intestinais, sua interação ao receptor específico é um alvo bastante atrativo para o desenvolvimento de medicamentos que impeçam a ação de TC. Nessa perspectiva, foi demonstrado que o PLS interage com o receptor GM1 e impede a ligação da TC, suprimindo eventos relacionados com a fisiopatologia da cólera.

Agentes anti-adesivos, ou análogos do receptor GM1, demonstraram ser eficazes num certo número de estudos e oferecem uma alternativa promissora para estratégias de tratamento convencionais. Estudos demonstram que os receptores gangliosídeos possuem alta afinidade de ligação a carboidratos, uma vez que a TC pode assumir a forma de um glicomimético, ligando-

se a uma multiplicidade de receptores gangliosídeos sobre o epitélio do hospedeiro, com uma maior afinidade para GM1 (SINCLAIR, 2009). Exemplo disso é o desenvolvimento de antagonistas do receptor GM1, a partir de derivados da galactose, como o protótipo *m*-nitrofenil galactosídeo (MNPG) que atua com alta afinidade na ligação aos resíduos de ceramida do receptor GM1, impedindo a ligação de TC (SAHA et al, 2013; SINCLAIR et al., 2009; SINCLAIR et al., 2008). De acordo com a caracterização química do PLS extraído de *H. musciformis*, a sua composição de base é derivada da galactose (COSENZA et al., 2014; ARMAN e QADER, 2012; AZIZA et al., 2008), sendo possível que estas regiões possam de alguma forma interagir com sítios de ligação no receptor GM1, prevenindo a ligação de TC. Estes resultados foram similares aos recentemente publicados por Araújo e colaboradores (2015) a partir da análise da goma do caju, um complexo heteroplossacarídeo, que contém 73% de galactose. Portanto, a influência direta do PLS na fisiopatologia da cólera pode oferecer uma promissora estratégia de controle para a doença.

Os resultados obtidos sugerem que o PLS extraído a partir da alga marinha vermelha *H. musciformis* possui atividade antidiarreica em roedores por inibir parâmetros fecais, *enteropooling*, estimular a atividade de Na⁺ K⁺ ATPase nos enterócitos do intestino delgado e reduzir a motilidade intestinal, associada a uma possível atividade anticolinérgica. Além disso, o PLS foi efetivo na inibição da diarreia inflamatória induzida por PGE₂ e diarreia secretória induzida por TC, provavelmente por bloquear a ligação TC-GM1. Diante disso, sugere-se o seguinte modelo de atuação do PLS representado na figura 11.

Estes dados indicam que o PLS pode ser utilizado como ferramenta importante na elaboração de novas substâncias com grande potencial antidiarreico, uma vez que estudos que investigam o efeitos desses compostos extraídos de algas marinhas em modelos experimentais que mimetizam a diarreia ainda são escassos. Assim, essas investigações proporcionam grandes expectativas para futuros estudos farmacológicos mais aprofundados, na perspectiva de um melhor entendimento de suas formas de ação e acerca de sua toxicidade, podendo revelar uma substância com grande aplicabilidade biotecnológica.

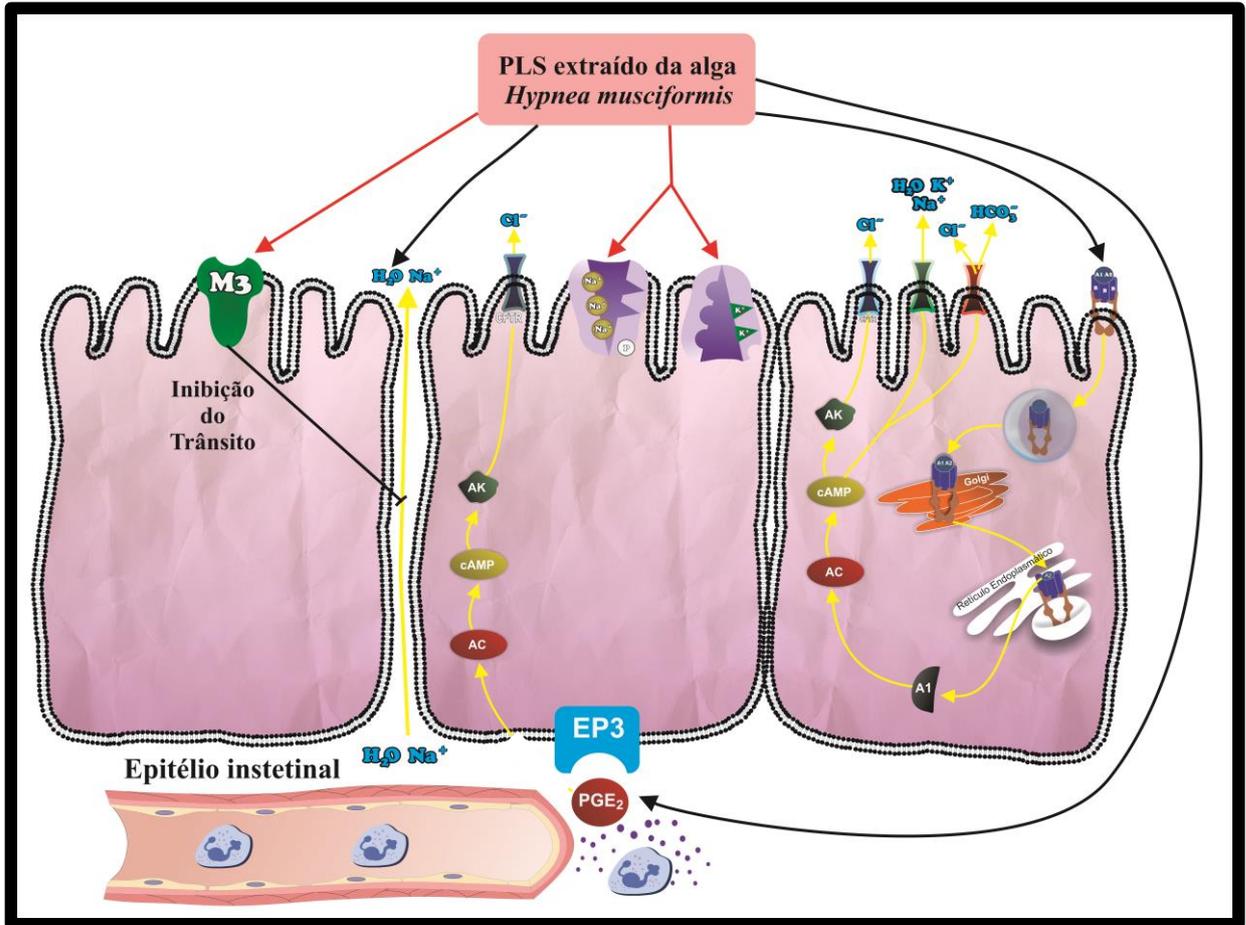


Figura 11. Modelo de atuação sugerido para o PLS na diarreia induzida por óleo de rícino, PGE₂ e toxina da cólera (TC) em roedores. Seta preta (inibe); seta vermelha (estimula). A1: Subunidade tóxica da toxina da cólera; AC: Adenilato ciclase; AK: Proteína quinase A; AMPc: Monofosfato cíclico de adenosina; CFTR: Regulador de condutância transmembrana da fibrose cística; EP3: Receptores 3 de prostaglandina E₂; M3: Receptores muscarínicos do tipo 3; PLS: polissacarídeo sulfatado extraído da alga marinha vermelha *H. musciformis*; PGE₂: Prostaglandina E₂.

8. CONCLUSÕES

- O PLS extraído da alga marinha vermelha *H. musciformis*, apresentou efeito antidiarreico em modelo de diarreia e *enteropooling* induzido por óleo de rícino, provavelmente devido a estimulação da atividade de Na⁺ K⁺ ATPase presente nos enterócitos no intestino delgado, bem como devido a redução da motilidade intestinal, associada a uma possível atividade anticolinérgica.
- O PLS não demonstrou efeito no esvaziamento gástrico em camundongos, sugerindo que a atividade inibitória sobre a motilidade gastrointestinal ocorra apenas em nível de intestino.
- O PLS inibiu o *enteropooling* induzido por PGE₂, sugerindo eficácia na diarreia inflamatória.
- O PLS apresentou atividade antissecretória em modelo de diarreia induzida pela toxina da cólera (TC) em alça intestinal isolada de camundongos, inibindo a perda de água e íons cloretos (Cl⁻) a partir dos enterócitos para o lúmen intestinal, provavelmente por interagir com o receptor GM1, prevenindo a ligação de TC ao receptor GM1.
- O PLS não demonstrou efeito no processo normal de absorção intestinal em alças isoladas de camundongos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, Y.; SMITH, S. L.; SCHWARTZ-ALBIEZ, R.; ANDREWS, K. T. Carrageenans inhibit the in vitro growth of *Plasmodium falciparum* and cytoadhesion to CD36. **Parasitology Research**, v. 97, p. 290-294, 2005.
- ADEYEMI, O. O.; AKINDELE, A. J. Antidiarrhoeal activity of the ethyl acetate extract of *Baphia nitida* (Papilionaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, p. 407–412, 2008.
- AL-ABRI, S. S.; BEECHING, N. J.; NYE, F. J. Traveller's diarrhea. The Lancet. **Infectious Diseases**, v. 5, p. 49-60, 2005.
- ALVES, M. G. C. F.; DORE, C. M. P.; CASTRO, A. J. G.; NASCIMENTO, M. S.; CRUZ, A. K. M.; SORIANO, E. M.; BENEVIDES, N. M. B.; LEITE, E. L. Antioxidant, cytotoxic and hemolytic effects of sulfated galactans from edible red alga *Hypnea musciformis*. **Journal of Applied Phycology**, v. 24, p. 1217-1227, 2012.
- ANASTOPOULOS, I.; KYZAS, G. Z. Progress in batch biosorption of heavy metals onto algae. **Journal of Molecular Liquids**, v. 209, p. 77-86, 2015.
- ANDRADE, J. A. B.; MOREIRA, C.; FAGUNDES-NETO, U. Persistent Diarrhea. **Jornal de Pediatria**, v. 76, p. 119-126, 2000.
- APONTE, G. B.; MANCILLA, C. A. B.; CARREAZO, N. Y.; GALARZA, R. A. R. Probiotics for treating persistent diarrhoea in children. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 11, 2010.
- ARAÚJO, T. S. L.; COSTA, D. S.; SOUSA, N. A.; SOUZA, L. K. M.; ARAÚJO, S.; OLIVEIRA, A. P.; SOUSA, F. B. M.; SILVA, D. A.; BARBOSA, A. L. R.; LEITE, J. R. S. A.; MEDEIROS, J. V. R. Antidiarrheal activity of cashew GUM, a complex heteropolysaccharide extracted from exudate of *Anacardium occidentale* L. in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 174, p. 299-307, 2015.
- ARMAN, M.; QADER, S. A. U. Structural analysis of kappa-carrageenan isolated from *Hypnea musciformis* (red algae) and evaluation as an elicitor of plant defense mechanism, **Carbohydrate Polymers**, v. 88, p. 1264-127, 2012.
- AWE, E. O.; KOLAWOLE, S. O.; AKEEL, K. O.; ABIODUN, O. O. Antidiarrheal activity of *Pyrenacanthastaudtii* Engl. (Iccacinaceae) aqueous leaf extract in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, p. 148-153, 2014.
- AWOUTERS, F. C.; NIEMEGEERS, J. E.; LENAERTS F. M.; JANSSEN P. A. Delay of castor oil diarrhoea in rats: a new way to evaluate inhibitors of prostaglandin biosynthesis. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 30, p. 41–45, 1978.
- AZIZA, M.; GIVERNAUD, T.; CHIKHAOUI-KHAY, M.; L. BENNASSER. Seasonal variation of the growth, chemical composition and carrageenan extracted from *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux harvested along the Atlantic coast of Morocco. **Scientific Research and Essay**, v. 2, p. 509-514, 2008.

BALUNAS, M.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, p. 431-441, 2005.

BARAHONA, T.; CHANDÍA, N. P.; ENCINAS, M. V.; MATSUHIRO, B.; ZÚÑIGA, E. A. Antioxidant capacity of sulfated polysaccharides from seaweeds. A kinetic approach. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 529–535, 2011.

BEUBLER, E.; JUAN, H. Effect of ricinoleic acid and other laxatives on net water flux and prostaglandins E release exotoxin in transmucosal water and electrolyte movement in canine jejunum. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 31, p. 681-5, 1979.

BEUBLER, E.; HORINA, G. 5-HT₂ receptor subtypes mediate cholera toxin-induced intestinal fluid secretion in the rat. **Gastroenterology**, v. 99, p. 83-89, 1990.

BEWAJI, C. O.; OLORUNSOGO, O. O.; BABABUNMI, E. A. Comparison of the membrane bound (Ca²⁺+Mg²⁺)-ATPase in erythrocyte ghosts from some mammalian species. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 82, p. 117-122, 1985.

BHATTACHARYA, S.; BLACK, R.; BOURGEOIS, L. CLEMENS, J.; CRAVIOTO, A.; DEEN, J. L.; DOUGAN, G. Public Health. The Cholera Crisis in Africa. **Science**, v. 324, p. 885, 2009.

BIRKENFELD, G. Tropical sprue: an unusual differential diagnosis in chronic diarrhoea. **Deutsche Medizinische Wochenschrift**, v. 134, p. 1478-1482, 2009.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; MUNRO, M. H.; NORTHCOTE, P. T.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 27, p. 165–237, 2010.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; MUNRO, M. H.; NORTHCOTE, P. T.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 28, p. 196–268, 2011.

BLUNT, J. W.; COPP, B.R.; MUNRO, M.H.G.; NORTHCOTE, P.T.; PRINSEP, M.R. Marine Natural Products. **Natural Product Reports**, v. 29, p. 144–222, 2012.

BONDU, S.; DESLANDES, E.; FABRE, M. S.; BERTHOU, C.; GUANGLI, Y. Carrageenan from *Solieria chordalis* (Gigartinales): Structural analysis and immunological activities of the low molecular weight fractions. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, p. 448-460, 2010.

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

BOTELLA, A.; DELVAUX, M.; FIORAMONTI, J.; FREXINOS, J.; BUENO, L. Receptor subtypes involved in dual effects induced by prostaglandin E₂ in circular smooth muscle from dog colon. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 273, p. 1008–14, 1995.

BOUCHAUD, O. Diarrhea in immune deficiency status. **La Revue du Praticien**, v. 46, p. 206-212, 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde (MS). Informações Técnicas, 2014. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/629-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/colera/11172-informacoes-tecnicas-colera>> Acesso em 01 de fevereiro de 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde (MS). Ministério da Saúde alerta os estados e municípios do Nordeste para ações de prevenção às diarreias, 2013. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/profissional-e-gestor/vigilancia/noticias-vigilancia/7645-ministerio-da-saude-alerta-os-estados-e-municipios-do-nordeste-para-aco-es-de-prevencao-as-diarreias>> Acesso em 25 de janeiro de 2016.

BRITO, A. R. M. S.; ANTONIO, M. A. Oral anti-inflammatory and ulcerogenic activities of a hydroalcoholic extract and partitioned fractions of *Turnera ulmifolia* (Turneraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 61, p. 215-28, 1998.

BRITO, T. V.; PRUDÊNCIO, R. S.; SALES, A. B.; VIEIRA JÚNIOR, F. C.; CANDEIRA, S. J. N.; FRANCO, A. X.; ARAGÃO, K. S.; RIBEIRO, R. A.; SOUZA, M. H. L. P.; CHAVES, L. S.; FREITAS, A. L. P.; MEDEIROS, J. V. R.; BARBOSA, A. L. R. Anti-inflammatory effect of a sulphated polysaccharide fraction extracted from the red algae *Hypnea musciformis* via the suppression of neutrophil migration by the nitric oxide signalling pathway. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 65, p. 724-733, 2013.

BROECK, D. V.; HORVATH, C.; WOLF, M. J. S. *Vibrio cholerae*: Cholera toxin. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 1771-1775, 2007.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamento. **Ciência e Cultura**, v. 55, p. 37-39, 2003.

CAMPO, V. L.; KAWANO, D. F.; SILVA JÚNIOR, D. B.; CARVALHO, I. Carrageenans: biological properties, chemical modifications and structural analysis – A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, p. 167–180, 2009.

CARVALHO, R. A. S.; SANTOS, V. S.; MELO, C. M.; GURGEL, R. Q. OLIVEIRA, C. C. C. Inequalities in health: living conditions and infant mortality in Northeastern Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 49, p. 100-105, 2015.

CHANGNON, A. Travelers' diarrhea. **La Revue du Praticien**, v. 46, p. 189-195, 1996.

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

CHAVES, L. S.; NICOLAU, L. A. D.; SILVA, R. O.; BARROS, F. C. N.; FREITAS, A. L. P.; ARAGÃO, K. S.; RIBEIRO, R. A.; SOUZA, M. H. L. P.; BARBOSA, A. L. R.; MEDEIROS, J. V. R. Antiinflammatory and antinociceptive effects in mice of a sulfated polysaccharide fraction extracted from the marine red algae *Gracilaria caudate*. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 35, p. 93-100, 2012.

CHOI, J. S.; KIM, J. W.; CHO, H. R., KIM, K. Y., LEE, J. K., SOHN, J. A., KU, S. K. Laxative effects of fermented rice extract in rats with loperamide-induced constipation. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 8, p. 1847-1854, 2014.

CIANCIA, M.; QUINTANA, I.; CEREZO, A. S. 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, p. 2503-2529, 2010.

COSENZA, V. A.; NAVARRO, D. A.; FISSORE, E. N.; ROJAS, A. M.; STORTZ, C. A. Chemical and rheological characterization of the carrageenans from *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamoroux. **Carbohydrate Polymers**, v. 102, p. 780-789, 2014.

- COSTER, T. S. et al. Safety, immunogenicity and efficacy of live attenuated vibrio cholera O139 vaccine prototype. **Lancet**, v. 345, p. 949-952, 1995.
- CROCI, T.; LANDI, M.; EMONDS-ALT, X.; LE FUR, G.; MAFFRAND, J. P.; MANARA, L. Role of tachykinins in castor oil diarrhoea in rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 121, p. 375-380, 1997.
- D'INCALCI, M.; GALMARINI, C. M. A review of trabectedin (ET-743): a unique mechanism of action. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 9, p. 2157-2163, 2010.
- DAMASCENO, S. R. B.; RODRIGUES, J. C.; SILVA, R. O.; NICOLAU, L. A. D.; CHAVES, L. S.; FREITAS, A. L. P.; SOUZA, M. H. L. P.; BARBOSA, A. L. R.; MEDEIROS, J. V. R. Role of the NO/KATP pathway in the protective effect of a sulfated-polysaccharide fraction from the algae *Hypnea musciformis* against ethanol-induced gastric damage in mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, p. 320-328, 2013.
- DE SCHEPPER, H. U.; CREMONINI, F.; PARK, M. I.; CAMILLERI, M. Opioids and the gut: pharmacology and current clinical experience. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 16, p. 383-94, 2004.
- DICARLO, G. D.; MASCOLO, N.; IZZO A. A.; CAPASSO, F.; AUTORE, G. Effects of quercetin on gastrointestinal tract in rats and mice. **Phytotherapy Research**, v. 8, p. 42-44, 1994.
- DILLEHAY, T. D.; RAMÍREZ, C.; PINO, M. COLLINS, M. B.; ROSSEN, J. PINO-NAVARRO, J. D. Monte Verde: Seaweed, Food, Medicine, and the Peopling of South American. **Science**, v. 320, 2008.
- DINESEN, L.; HARBORD, M. Acute diarrhoea. **Medicine**, v. 41, p. 104-107, 2013.
- EL GAMAL, A. A. Biological importance of marine algae. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 18, p. 1-25, 2010.
- ENCK, P.; JUNNE, F., KLOSTERHALFEN, S.; ZIPFEL, S.; MARTENS, U. Therapy options in irritable bowel syndrome. **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**, v. 22, p. 1402-11, 2010.
- ESMANN, M.; FEDOSOVA, N. U.; OLESEN, C. Na, K-ATPase structure/function relationships probed by the denaturant urea. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1848, p. 1212-1223, 2015.
- FARIAS, W. R.; VALENTE, A. P.; PEREIRA, M. S.; MOURÃO, P. A. Structure and anticoagulant activity of sulfated galactans. Isolation of a unique sulfated galactan from the red alga *Botryocladia occidentalis* and comparison of its anticoagulant action with that of sulfated galactans from invertebrates. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 29299-29307, 2000.
- FARUQUE, S. M.; ALBERT, M. J.; MEKALANOS, J. J. Epidemiology, genetics, and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, **Washington**, v. 62, p. 1301-1314, 1998.
- FIELD, M. Intestinal ion transport and the pathophysiology of diarrhea. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 111, p. 931-943, 2003.

FLACH, C. F.; QADRI, F.; BHUIYAN, T. R.; ALAM, N. H.; JENNISCHE, E.; HOLMGREN, J.; LONNROTH, I. Differential expression of intestinal membrane transporters in cholera patients. **FEBS Letters**, v. 581, p. 3183-3188, 2007.

FLEITA, D.; EL-SAYED, M.; RIFFAT, D. Evaluation of the antioxidant activity of enzymatically-hydrolyzed sulfated polysaccharides extracted from red algae; *Pterocladia capillacea*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, p. 1236-1244, 2015.

FU, Q.; CHEN, X.; XIANG, Y. K. Compartmentalization of beta-adrenergic signals in cardiomyocytes. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 23, p. 250–256, 2013.

FURTADO, M. R. Desequilíbrio climático abre mercado para novos hidrocolóides. **Química e Derivados**, v. 430, p. 1-4, 2004.

GANGINELLA, T. S.; PHILLIPS, S. F. Ricinoleic acid: current view of an ancient oil. **American Journal of Digestive Diseases**, v. 20, p. 1171–1177, 1975.

GONDIM, F. A.; RODRIGUES, C. L.; GRAÇA, J. R.; CAMURCA, F. D.; ALENCAR, H. M.; SANTOS, A. A.; ROLA, F. H. Neural mechanisms involved in the delay of gastric emptying and gastrointestinal transit of liquid after thoracic spinal cord transection in awake rats. **Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical**, v. 87, p. 52-58, 2001.

GONZÁLEZ, E. S.; CALVO, L. E. R.; ARBELO, T. F. Persistent Diarrhea. **GEN**, v. 49, p. 74-81, 1995.

GORBACH, S. L. Bismuth therapy in gastrointestinal diseases. **Gastroenterology**, v. 99, p. 863–875, 1990.

GORKIEWICZ, G.; THALLINGER, G. G.; TRAJANOSKI, S.; LACKNER, S.; STOCKER, G.; HINTERLEITNER, T.; GULLY, C.; HOGENAUER, C. Alterations in the colonic microbiota in response to osmotic diarrhea. **PLoS One**, v. 8, p. 1-17, 2013.

GHANNAM, A.; ABBAS, A.; ALEK, H.; AL-WAARI, Z.; AL-KTAIFANI, M. Enhancement of local plant immunity against tobacco mosaic virus infection after treatment with sulphated-carrageenan from red alga (*Hypnea musciformis*). **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 84, p. 19-27, 2013.

GREER, C. W.; SHOMER, L.; GOLDSTEIN, M. E.; YAPHE, W. Analysis of carrageenan from *Hypnea musciformis* by using k and ι-carrageenan and ¹³C NMR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 129, p. 189–196, 1984.

GUANDALINI, S. Probiotics for prevention and treatment of diarrhea. **Journal of clinical gastroenterology**, v. 45, p. 49–53, 2011.

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

GUPTA, S.; ABU-GHANNAM, N. Recent developments in the application of seaweeds or seaweed extracts as a means for enhancing the safety and quality attributes of foods. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 12, p. 600-609, 2011.

HAMMER, H. F.; SANTA ANA, C. A.; SCHILLER, L. R.; FORDTRAN, J. S. Studies of osmotic diarrhea induced in normal subjects by ingestion of polyethylene glycol and lactulose. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 84, p. 1056-1062, 1989.

- HAN, F.; YAO, W.; YANG, X.; LIU, X.; GAO, X. Experimental study on anticoagulant and antiplatelet aggregation activity of a chemically sulfated marine polysaccharide YCP. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 36, p. 201–207, 2005.
- HEARN, P.; DOHERTY, T. Diarrhoea in travelers. **Medicine**, v. 42, p. 84-88, 2013.
- HENKEL, T.; BRUNNE, R. M.; MÜLLER, H.; REICHEL, F. Statistical investigation into the structural complementarity of natural products and synthetic compounds. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 38, p. 643 – 647, 1999.
- INCE, S.; TURKMEN, R.; YAVUZ, H. The effect of boric acid on acetylcholine, bethanechol and potassium-evoked responses on ileum of rat. **Autonomic & Autacoid Pharmacology**, v. 31, p. 50–56. 2011.
- IZZO, A. A.; MASCOLO, N.; VIOLA, P.; CAPASSO, F. Inhibitors of nitric oxide synthetase enhance rat ileum contractions induced by ricinoleic acid *in vitro*. **European Journal of Pharmacology**, v. 243, p. 87-90, 1993.
- JIAO, G.; YU, G.; ZHANG, J.; EWART, H. S. Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. **Marine Drugs**, v. 9, p. 196-223, 2011.
- JONKERS, D.; STOCKBRUGGER, R. Review article: probiotics in gastrointestinal and liver diseases. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 26, p. 133-148, 2007.
- JOOB, B.; WIWANITKIT, V. Acute diarrhea in HIV infected patient receiving antiretroviral therapy: is there any role of microscopic stool examination at present? **Journal of Acute Disease**, v. 3, p. 62-63, 2014.
- KAISER, L.; SURAWICZ, C. M. Infectious causes of chronic diarrhea. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 26, p. 563–571, 2012.
- KAPER, J. B.; LOCKMAN, H.; BALDINI, M. M.; LEVINE, M. M. Recombinant nontoxinogenic *Vibrio cholera* strain as attenuated cholera vaccine candidates. **Nature**, v. 308, p. 655-658, 1984.
- KAPER, J. B.; MORRIS, J. G. J.; LEVINE, M. M. Cholera. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, p. 48-86, 1995.
- KARAKIULAKIS, G.; ROTH, M. Muscarinic Receptors and Their Antagonists in COPD: Anti-Inflammatory and Antiremodeling Effects. **Mediators of Inflammation**, v. 2012, p. 1-9, 2012.
- KAWAHARA, K.; HOHJOH, H.; INAZUMI, T.; TSUCHIYA, S.; SUGIMOTO, Y. Prostaglandin E2-induced inflammation: Relevance of prostaglandin E receptors. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1851, p. 414-421, 2014.
- KELLY, P. Infectious diarrhoea. **Medicine**, v. 39, p. 202-206, 2011.
- KIM, S. K.; WIJESEKARA, I. Development and biological activities of marinederived bioactive peptides: A review. **Journal of Functional Foods**, v. 2, p. 1–9, 2010.
- KLOAREG, B.; QUATRANO, R. S. Structure of the wall of marine algae and ecophysiological functions of matrix polysaccharides. **Oceanography Marine Biological Annual Review**, v. 26, p. 259-315, 1988.

KNUTSEN, S. H.; MYSLABODSKI, D. E.; LARSEN, B.; USOV, A. I. A modified system of nomenclature for red algal galactans. **Botanica Marina**, v. 37, p. 163-169, 1994.

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

LANGENBERG M. C. C.; WISMANS, P. J.; VAN GENDEREN, P. J. J. Distinguishing tropical sprue from celiac disease in returning travellers with chronic diarrhoea: A diagnostic challenge? **Travel medicine and infectious disease**, v. 12, p. 401-5, 2014.

LENCER, W. I. Retrograde transport of cholera toxin into the ER of host cells. **International journal of medical microbiology**, v. 293, p. 491-494, 2004.

LI, S. T.; GROSSMAN, D. C.; CUMMING, P. Loperamide therapy for acute diarrhea in children: systematic review and meta-analysis. **PLoS Medicine**, v. 27, e98, 2007.

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

LIMA, A. A. M.; MOORE, S. R.; BARBOZA, M. S. J.; SOARES, A. M.; SCHLEUPNER, M. A.; NEWMAN, R. D.; SEARS, C. L.; NATARO, J. P.; FEDORKO, D. P.; WUHIB, T.; SCHORLING, J. B.; GUERRANT, R. L. Persistent diarrhea signals a critical period of increased diarrhea burdens and nutritional shortfalls: a prospective cohort study among children in Northeastern Brazil. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, p. 1643-1651, 2000.

LU, L.; KHAN, S.; LENCER, W.; WALKER, W. A. Endocytosis of cholera toxin by human enterocytes is developmentally regulated. **American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, v. 289, p. 332-341, 2005.

LUDERER, J. R.; DEMERS, L. M.; NOMIDES, C. T.; HAYES, A. H. Jr. Mechanism of action of castor oil: a biochemical link to the prostaglandins. **Advances in Prostaglandin and Thromboxane Research**, v. 8, p. 1633-1635, 1980.

MANDAL, S.; MANDAL, M. D.; PAL, N. K. Cholera: a great global concern. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 4, p. 573 – 580, 2011.

MASCOLO, N.; IZZO, A. A.; BARBATO, F.; CAPASSO, F. Inhibitors of nitric oxide synthetase prevent castor-oil induced diarrhea in the rat. **British Journal of Pharmacology**, v. 108, p. 861–864, 1993.

MASCOLO, N.; IZZO, A. A.; AUTORE, G.; BARBATO, F.; CAPASSO, F. Nitric Oxide and Castor Oil-Induced Diarrhea. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 268, p. 291-295, 1994.

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

MAYER, A. M. S.; GLASER, K. B.; CUEVAS, C.; JACOBS, R. S.; KEM, W.; LITTLE, R. D.; MCLINTOSH, J. M.; MEWMAN, D. J.; POTTS, B. C.; SHUSTER, D. E. The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 31, p. 255–265, 2010.

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

MCGIVER, J. G. Targeting N-type and T-type calcium channels for the treatment of pain. **Drug Discovery Today**, v. 11, p. 245–253, 2006.

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

MICHEL, G.; TONON, T.; SCORNET, D.; COCK, J.M.; KLOAREG, B. The cell wall polysaccharide metabolism of the brown alga *Ectocarpus siliculosus*. Insights into the evolution of extracellular matrix polysaccharides in Eukaryotes. **New Phytology**, v. 188, p.82-97, 2010.

MILJANIC, G. P. Ziconotide: neuronal calcium channel blocker for treating severe chronic pain. **Current Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 3029–3040, 2004.

MOHAMMAD, R.; MOHSEN, Z.; ABOULGASM, O.; MOHAMMAD, T. A.; MOSTAFA, G.; ROGAEIEH, S.; SHAHLA, F.; HOSEIN, G.; SAEID, M.; PARISA, I.; MONA, M. Z.; MASSOUD, H.; AZAR, V.; RANA, A. Survey of epidemiology and bacteriology features of cholera in Iran. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 3, p. 45-47, 2010.

MONTASER, R.; LUESCH, H. Marine natural products: a new wave of drugs? **Future Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 1475–1489, 2011.

MOON, C.; ZHANG, W.; SUNDARAM, N.; YARLAGADDA, S.; REDDY, V. S.; ARORA, K.; HELMRATH, M. A.; NAREN, A. P. Drug-induced secretory diarrhea: A role for CFTR. **Pharmacological Research**, v. 102, p. 107–112, 2015.

MOORE, S. R.; LIMA, N. L.; SOARES, A. M.; ORÌA, R. B.; PINKERTON, R. C.; BARRETT, L. J. Prolonged episodes of acute diarrhea reduce growth and increase risk of persistent diarrhea in children. **Gastroenterology**, v. 139, p. 1156–1164, 2010.

MOORE, S.; THOMSON, N.; MUTREJA, A.; PIARROUX, R. Widespread epidemic cholera caused by a restricted subset of *Vibrio cholerae* clones. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, p. 373-379, 2014.

MORAIS, T. C.; LOPES, S. C.; CARVALHO, K. M. M. B.; ARRUDA, B. R.; SOUZA, F. T. C.; TREVISAN, M. T. S., et al. Mangiferin, a natural xanthone, accelerates gastrointestinal transit in mice involving cholinergic mechanism. **World Journal of Gastroenterology**, v. 18, p. 3207-3214, 2012.

MOURAD, F. H. 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.

MUNOS, M. K.; WALKER, C. L. F.; BLACK, R. E. The effect of oral rehydration solution and recommended home fluids on diarrhea mortality. **International Journal of Epidemiology**, v. 39, p. 175-187, 2010.

MUNRO, M. H. G.; BLUNT, J. W.; DUMDEI, E. J.; HICKFORD, S. J. H.; LILL, R. E.; LI, S.; BATTERSHILL, C. N.; DUCKWORTH, A. R. The discovery and development of marine compounds with pharmaceutical potential. **Journal of Biotechnology**, v. 70, p. 15–25, 1999.

- MURHERJEE, P. K.; SAHA, K.; MURUGESAN, T.; MANDAL, S. C.; PAL, M.; SAHA, B. P. Screening of anti-diarrhoeal profile of some plant extracts of a specific region of West Bengal, India. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 1, p. 85-89, 1998.
- NATHANSON, N. M. Synthesis, Trafficking, and Localization of Muscarinic Acetylcholine Receptors. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 119, p. 33-43, 2008.
- NAUER, F.; CASSANO, V.; OLIVEIRA, M. C. Description of *Hypnea pseudomusciformis* sp. nov., a new species based on molecular and morphological analyses, in the context of the *H. musciformis* complex (Gigartinales, Rhodophyta). **Journal of Applied Phycology**, v. 27, p. 2405-2417, 2014.
- NISBET, L. J.; MOORE, M. Will natural products remain an important source of drug research for the future? **Current Opinion in Biotechnology**, v. 8, p. 708-712, 1997.
- O' NEAL, C. J.; JOBLING, M. G.; HOLMES, R. K.; HOL, W. G. J. Structural basis for the activation of cholera toxin by human ARF6-GTP. **Science**, v. 309, p. 1093–1096, 2005.
- OHTA, Y.; LEE, J.; HAYASHI, K.; HAYASHI, T. Isolation of sulfated galactan from *Codium fragile* and its antiviral effect. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 32, p. 892–898, 2009.
- OWENS, R. C. Clostridium difficile-associated disease: changing epidemiology and implications for management. **Drugs**, v. 67, p. 487-502, 2007.
- PALOMBO, E. A. Phytochemicals from Traditional Medicinal Plants used in the Treatment of Diarrhoea: Modes of Action and Effects on Intestinal Function. **Phytotherapy Research**, v. 20, p. 717-724, 2006.
- PANG, X.; LEE, B. E. Laboratory Diagnosis of Noroviruses: Present and Future. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 35, p. 345-362, 2015.
- PERCIVAL, E.; MCDOWELL, R. H. Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides. **New York. Academic Press**, 1967.
- PEREIRA, M. G.; BENEVIDES, N. M. B.; MELO, M. R. S.; VALENTE, A. P.; MELO, F. R.; MOURÃO, P. A. S. 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, p. 2015-2023, 2005.
- PETERSON, J. W.; OCHOA, L. G.; Role of Prostaglandins and Effects of Cholera Toxin. **Science**, v. 245, p. 857-859, 1989.
- PETERSON, J. W.; REITMEYER, J.C.; JACKSON, C. A.; ANSARI, G. A. Protein synthesis is required for cholera toxin-induced stimulation of arachidonic acid metabolism. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1092, p. 79–84, 1991.
- PETERSON, J. W.; LU, Y.; DUNCAN, S.; CANTU, J.; CHOPRA, A. K. Interactions of intestinal mediators in the mode of action of cholera toxin. **Journal of Medical Microbiology**, v. 41, p. 3–9, 1994.
- PETRI, W. A.; MILLER, M. BINDER, H. J.; LEVINE, M. M. DILLINGHAM, R.; GUERRANT, R. L. Enteric infections, diarrhea and their impact on function and development. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 118, p. 1277-1290, 2008.

- PINA, D. G.; JOHANNES, L. Cholera and Shiga toxin B-subunits: thermodynamic and structural considerations for function and biomedical applications. **Toxicon**, v. 45, p. 389-393, 2005.
- PINTO, A.; CALIGNANO, A.; MASCOLO, N.; AUTORE, G.; CAPASSO, F. Castor oil increases intestinal formation of platelet-activating factor and acid phosphatase release in the rat. **British Journal of Pharmacology**, v. 96, p. 872-874, 1989.
- PIRES, C. L.; RODRIGUES, S. D.; BRISTOT, D.; GAETA, H. H.; TOYAMA, D. O.; FARIAS, W. R. L.; TOYAMA, M. H. Evaluation of Macroalgae Sulfated Polysaccharides on the *Leishmania (L.) amazonensis* Promastigote. **Marine Drugs**, v. 11, p. 934-943, 2013.
- PIRES, R. N.; MONTEIRO, A. A.; CARNEIRO, L. C.; et al. Clostridium difficile infection in Brazil: A neglected problem? **American Journal of Infection Control**, v. 42, p. 459-60, 2014.
- POMIM, V. H. Structural and functional insights into sulfated galactans: a systematic review. **Glycoconjugate Journal**, v. 27, p. 1-12, 2010.
- POPOFF, M. R.; POLAIN, B. Bacterial Toxins and the Nervous System: Neurotoxins and Multipotential Toxins Interacting with Neuronal Cells. **Toxins**, v. 2, p. 683-737, 2010.
- PRASAD, S. K.; JAIN, D.; PATEL, D. K.; SAHU, A. N.; HEMALATHA, S. Antisecretory and antimotility activity of *Aconitum heterophyllum* and its significance in treatment of diarrhea. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 46, p. 82-87, 2014.
- PRESSLEY, T. A.; ALLEN, J. C.; CLARKE, C. H.; ODEBUNMI, T.; HIGHAM, S. C.; Amino-terminal processing of the catalytic subunit from Na⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾-ATPase. **The American Journal of Physiology**, v. 271, p. 825-832, 1996.
- RACHMILEWITZ, D.; KARMELI F.; OKON E. Effects of bisacodyl on C-AMP and prostaglandin E2 contents (Na⁺ K⁺) ATPase, adenylyl cyclase and phosphodiesterase activities of rat intestine. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 25, p. 602. 1980.
- RACUSEN, L. C.; BINDER, H. J. Ricinoleic acid stimulation of active anion secretion in colonic mucosa of the rat. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 63, p. 743-749, 1979.
- RAHMAN, K.; BARUA, S.; ISLAM, F.; ISLAM, R.; SAYEED, M. A.; PARVIN, S.; ISLAM, E. Studies on the anti-diarrheal properties of leaf extract of *Desmodium puchellum*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 3, p. 639-643, 2013.
- RANJBAR, R.; POURSHAFIE, M. R.; SADEGHIFARD, N.; KARAMI, A. HAMIDIAN, M.; IZADI, M. et al. Molecular characterization of epidemic isolates of *Vibrio cholera* O1 by arbitrarily primed PCR (AP-PCR). **Iranian Journal of Public Health**, v. 37, p. 83-87, 2008.
- RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603-613, 2001.
- RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 7. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2007.
- RECALDE, M. P.; CANELÓN, D. J.; COMPAGNONE, R. S.; MATULEWICZ, M. C.; CEREZO, A. S. CIANCIA, M. Carrageenan and agar structures from the red seaweed *Gymnogongrus tenuis*. **Carbohydrate Polymers**, v. 136, p. 1370-1378, 2016.

- REYNELL, P. C.; SPRAY, G. H. The simultaneous measurement of absorption and transit in the gastrointestinal tract of the rat. **The Journal of physiology**, v. 15, p. 361-371, 1978.
- RIVERA, F. P.; MEDINA, A. M.; BEZADA, S.; VALENCIA, R.; BERNAL, M.; MEZA, R.; MAVES, R. C.; OCHOA, T. J. Bovine Lactoferrin Decreases Cholera-Toxin-Induced Intestinal Fluid Accumulation in Mice by Ganglioside Interaction. **PLoS One**, v. 8, p. 1-8, 2013.
- ROBERT, A.; NEZAMIS, J. E.; LANCASTER, C.; HANCHAR, A. J.; KLEPPER, M. S. Enteropooling Assay: a test for diarrhea produced by prostaglandins. **Prostaglandins**, v. 11, p. 809-828, 1976.
- ROCHAS, C.; LAHAYE, M.; YAPHE, W. Sulfate Content of Carrageenan and Agar Determined by Infrared Spectroscopy. **Botanica Marina**, v. 29, p. 335-340, 1986.
- SACK, D. A.; SACK, R. B.; NAIR, G. B.; SIDDIQUE, A. K. Cholera. **The Lancet**, v. 363, p. 223-233, 2004.
- SAHA, P.; DAS, B.; CHAUDHURI, K. Role of 6-Gingerol in Reduction of Cholera Toxin Activity In Vitro and In Vivo. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, p. 4373-4380, 2013.
- SAITO, C. H.; BASTOS, F. P.; ABEGG, I. Teorias-guia educacionais da produção dos materiais didáticos para a transversalidade curricular do meio ambiente do MMA. **Revista Iberoamericana de Educación**, v. 45, 2008.
- SALAKO, O. A.; AKINDELE, A. J.; SHITTA, O. M.; ELEGUNDE, O. O.; ADEYEMI, O. O. Antidiarrhoeal activity of aqueous leaf extract of *Caladium bicolor* (Araceae) and its possible mechanisms of action. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 176, p. 225-231, 2015.
- SANTOS, L. A. C. Um Século e Cólera: Itinerário do Medo. **Revista de Saúde Coletiva**, v. 4, p. 79-110, 1994.
- SANTOS, C. L.; MEDEIROS, B. A.; PALHETA-JUNIOR, R. C.; MACEDO, G. M.; NOBRE-E-SOUZA, M. A.; TRONCON, L. E.; SANTOS, A. A.; SOUZA, M. H. Cyclooxygenase-2 inhibition increases gastric tone and delay gastric emptying in rats. **Neurogastroenterology and Motility**, v. 19, p. 225-232, 2007.
- SANTOS, N. D.; GOMES, D. L.; COSTA, L. S.; CORDEIRO, S. L.; COSTA, M. S. S. P.; TRINDADE, E. S.; FRANCO, C. R. C.; SCORTECCI, K. C.; LEITE, E. L.; ROCHA, H. A. O. Freshwater Plants Synthesize Sulfated Polysaccharides: Heterogalactans from water Hyacinth (*Eicchornia crassipes*). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 961-976, 2012.
- SARIM, R. V.; NARVAL, S.; BAFINA, P. A. Anti-diarrhoeal activity of aqueous extract of *Ocimum kilimandscharicum*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 148, p. 223-228, 2013.
- SAWASVIROJWONG, S.; SRIMANOTE, P.; CHATSUDTHIPONG, V.; MUANPRASAT, C. An Adult Mouse Model of *Vibrio cholerae* -induced Diarrhea for Studying Pathogenesis and Potential Therapy of Cholera. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, e2293, 2013.
- SCHILLER, L. R. Chronic diarrhea. **Gastroenterology**, v. 8, p. 259-66, 2004.

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

SCHMIDT, C.; BAUMEISTER, B.; KIPNOWSKI, J.; SCHIERMEYER-DUNKHASE, B.; VETTER, H. Alteration of prostaglandin E2 and leukotriene B4 synthesis in chronic inflammatory bowel disease. **Hepatogastroenterology**, v. 43, p. 508-1512, 1996.

SESAPI - Secretária Estadual de Saúde Piauí. Diarreia 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>> Acesso em 25 de janeiro de 2016.

SHAHBAZIAN, A.; HEINEMANN, A.; PESKAR, B. A.; HOLZER, P. Differential peristaltic motor effects of prostanoid (DP, EP, IP, TP) and leukotriene receptor agonists in the guinea pig isolated small intestine. **British Journal of Pharmacology**, v. 137, p. 1047–1054, 2002.

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. 155-161, 2013.

SILVA, F. R. F.; DORE, C. M. P. G.; MARQUES, C. T. M.S. Nascimento, N.M.B. Benevides, H.A.O. Rocha, S.F. Chavante, E. L. Leite. Anticoagulant activity, paw edema and pleurisy induced carrageenan: action of major types of commercial carrageenans, **Carbohydrate Polymeres**, v. 79, p. 26–33, 2010.

SILVA, R. O.; SANTOS, G. M. P.; NICOLAU, L. A. D.; LUCETTI, L. T.; SANTANA, A. P. M.; CHAVES, L. S.; BARROS, F. C. N.; FREITAS, A. L. P.; SOUZA, M. H. L. P.; MEDEIROS, J. V. R. Sulfated-Polysaccharide fraction from red algae *Gracilaria caudata* protects mice gut against ethanol-induced damage. **Marine Drugs**, v. 9, p. 2188-2200, 2011.

SILVA, R. O.; SANTANA, A. P. M.; CARVALHO, N. S.; BEZERRA, T. S.; OLIVEIRA, C. B.; DAMASCENO, S. R. B.; CHAVES, L. S.; FREITAS, A. L. P.; SOARES, P. M. G.; SOUZA, M. H. L. P.; BARBOSA, A. L. R.; MEDEIROS, J. V. R. A sulfated-polysaccharide fraction from seaweed *Gracilaria birdiae* prevents naproxen-induced gastrointestinal damage in rats. **Marine Drugs**, v. 10, p. 2618-2633, 2012.

SINCLAIR, H. R.; SMEJKAL, C. W.; GLISTER, C.; KEMPB, F.; HEUVEL, E.; SLEGTE, J.; GIBSON, G. R.; RASTALL, R. A. Sialyloligosaccharides inhibit cholera toxin binding to the GM1 receptor. **Carbohydrate Research**, v. 343, p. 2589–2594, 2008.

SINCLAIR, H. R.; SLEGTE, J.; GIBSON, G. R.; RASTALL, R. A. Galactooligosaccharides (GOS) Inhibit *Vibrio cholerae* Toxin Binding to Its GM1 Receptor. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 3113–3119, 2009.

SINGH, S.; AK, R.; SHARMA, P.; BARSHILIYA, Y.; SIHARE, M.; NEGI, A. Antidiarrhoeal activity of *Rotula aquatica* in rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, p. 175-177, 2012.

SPILLER, R. Role of motility in chronic diarrhoea. **Neurogastroenterology and Motility**, v. 18, p. 1045–55, 2006.

TANGPU, V.; YADAV, A. K. Antidiarrhoeal activity of *Rhus javanica* ripen fruit extract in albino mice. **Fitoterapia**, v. 75, p. 39–44, 2004.

TINKER, J. K.; ERBE, J. L.; HOLMES, R. K. Characterization of Fluorescent Chimeras of *Cholera Toxin* and *Escherichia coli* Heat-Labile Enterotoxins Produced by Use of the Twin Arginine Translocation System. **Infection and Immunity**, v. 76, p. 3627-3635, 2005.

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

TUNARU, S.; ALTHOFF, T. F.; NUSING, R. M.; DIENER, M.; OFFERMANN, S. Castor oil induces laxation and uterus contraction via ricinoleic acid activating prostaglandin EP3 receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, p. 9179-9184, 2012.

UNICEF - Fundo das Nações Unidas para a Infância. UNICEF e OMS lançam relatório sobre diarreia, a segunda maior causa de mortalidade infantil, 2009. Disponível em: <http://www.unicef.org/brazil/pt/media_16165.htm> Acesso em 25 de janeiro de 2016.

USOV, A. I.; YAROTSKY, S. V.; SHASHKOV, A. S. Carbon-13 NMR spectroscopy of red algal galactans. **Biopolymers**, v. 19, p. 977-990, 1980.

VELDE, F. V.; KNUTSEN, S. H.; USOV, A. I.; ROLLEMA, H. S.; CERESO, A. S. ¹H and ¹³C high resolution NMR spectroscopy of carrageenans: application in research and industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 13, p. 73-92, 2002.

VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. C. E. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à biorremediação e à química analítica. **Química Nova**, v. 27, p. 139-145, 2004.

WHO. World Health Organization. Cholera, 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs107/en/>> Acesso em 31 de janeiro de 2016.

WHYTE, L. A.; JENKIINS, H. R. Pathophysiology of diarrhoea. **Occasional Review**, v. 22, p. 443-447, 2012.

WIJESEKARA, I.; PANGESTUTI, R.; KIM, S. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, p. 14-21, 2011.

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

XIE, C.; LI, J.; WANG, K.; LI, Q.; CHEN, D. Probiotics for the prevention of antibiotic-associated diarrhoea in older patients: A systematic review. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 13, p. 128-134, 2015.

XU, Q.; SHEN, Z.; WANG, Y.; GUO, S.; LI, F.; WANG, Y.; ZHOU, C. Anti-diarrhoeal and anti-microbial activity of *Flos populi* (male inflorescence of *Populus tomentosa* Carrière) aqueous extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 148, p. 640-646, 2013.

YANG, B.; YU, G.; ZHAO, X.; JIAO, G.; REN, S.; CHAI, W. Mechanism of mild acid hydrolysis of galactan polysaccharides with highly ordered disaccharide repeats leading to a complete series of exclusively odd-numbered oligosaccharides. **The FEBS Journal**, v. 276, p. 2125-2137, 2009.

ZEMELMAN, B. V.; WALKER, W. A.; CHU, S. W. Expression and Developmental Regulation of Na⁺,K⁺ Adenosine Triphosphatase in the Rat Small Intestine. **The Journal of clinical investigation**, v. 90, p. 1016-1022, 1992.

ZHA, X. Q.; LU, C. Q.; CUI, S. H.; PAN, L. H.; ZHANG, H. L.; WANG, J. H.; LUO, J. P. Structural identification and immunostimulating activity of a *Laminaria japonica* polysaccharide. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 78, p. 429–438, 2015.

ANEXO

Anexo I. Carta de aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da UFC

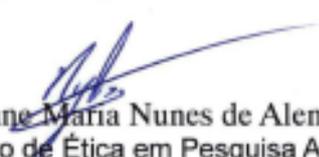
Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

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/DFF/FAMED/UFC
MAT. SIAPE 2166369

APÊNDICE

(Artigo referente à dissertação publicado na Revista *International Journal of Biological Macromolecules*)

Accepted Manuscript

Title: The efficacy of a sulphated polysaccharide fraction from *Hypnea musciformis* against diarrhea in rodents

Author: Nayara A. Sousa Francisco Clark N. Barros Thiago S.L. Araújo Douglas S. Costa Luan Kelves M. Souza Francisca Beatriz M. Sousa Ana Carolina M. Leódido Dvison M. Pacífico Simone de Araújo Francisco F. Bezerra Ana Lúcia P. Freitas Jand Venes R. Medeiros



PII: S0141-8130(16)30159-3
DOI: <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.02.028>
Reference: BIOMAC 5837

To appear in: *International Journal of Biological Macromolecules*

Received date: 21-10-2015
Revised date: 4-2-2016
Accepted date: 10-2-2016

Please cite this article as: Nayara A.Sousa, Francisco Clark N.Barros, Thiago S.L.Araújo, Douglas S.Costa, Luan Kelves M.Souza, Francisca Beatriz M.Sousa, Ana Carolina M.Leódido, Dvison M.Pacífico, Simone de Araújo, Francisco F.Bezerra, Ana Lúcia P.Freitas, Jand Venes R.Medeiros, The efficacy of a sulphated polysaccharide fraction from *Hypnea musciformis* against diarrhea in rodents, *International Journal of Biological Macromolecules* <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.02.028>

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

**The efficacy of a sulphated polysaccharide fraction from
Hypnea musciformis against diarrhea in rodents**

Nayara A. Sousa^{a,1}, Francisco Clark N. Barros^{b,c,1}, Thiago S. L. Araújo^a, Douglas S. Costa^d, Luan Kelves M. Souza^e, Francisca Beatriz M. Sousa^a, Ana Carolina M. Leóido^a, Dvison M. Pacífico^a, Simone de Araújo^a, Francisco F. Bezerra^b, Ana Lúcia P. Freitas^b and Jand Venes R. Medeiros^{a,d,e,*}

^aBiotechnology and Biodiversity Center Research, BIOTEC, Post-graduation Program in Biotechnology, Federal University of Piauí, Parnaíba, Piauí, Brazil

^bDepartment of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

^cFederal Institute of Education, Science and Technology of Ceará, Juazeiro do Norte, Ceará, Brazil

^dMedicinal Plant Research Center, NPPM, Post-graduation Program in Pharmacology, Federal University of Piauí, Teresina, Piauí, Brazil

^ePost-graduation Program in Biomedical Sciences, Federal University of Piauí, Parnaíba, Piauí, Brazil

*Corresponding author: J.V.R. Medeiros; Av. São Sebastião, 2819, CEP: 64202-020, Parnaíba, PI, Brazil. Tel.: +55 86 99862374; Fax: +55 86 33235406. E-mail address: jandvenes@ufpi.edu.br.

¹These authors contributed equally to this work.

ABSTRACT

Seaweeds are sources of diverse bioactive compounds, such as sulphated polysaccharides. This study was designed to evaluate the chemical composition and anti-diarrheal activity of a fraction of sulphated polysaccharide (PLS) obtained from the red seaweed *Hypnea musciformis* in different animal models, and to elucidate the underlying mechanisms. PLS was obtained by aqueous extraction, with a yield of 31.8% of the seaweed dry weight. The total carbohydrate content accounted for 99% of the sample. The sulfate content of the polysaccharide was 5.08% and the percentage of carbon was 25.98%. Pretreatment with all doses of PLS inhibited castor oil-induced diarrhea, with reduction of the total amount of stool, diarrheal stools, and the severity of diarrhea. PLS (90 mg/Kg) decreased castor oil- and PGE₂-induced enteropooling. In addition, PLS (90 mg/Kg) increased the Na⁺/K⁺-ATPase activity in the small intestine and reduced gastrointestinal transit, possibly via activation of cholinergic receptors. Interestingly, the cholera toxin-induced fluid secretion and Cl⁻ ion levels decreased in the intestinal contents of the animals pretreated with PLS (90 mg/kg), probably via reduction of toxin–GM1 receptor binding. In conclusion, PLS exerts anti-diarrheal activity by increasing Na⁺/K⁺-ATPase activity, inhibiting gastrointestinal motility, and blocking the toxin–GM1 receptor binding.

Keywords: Algae, sulfated polysaccharide, cholera.

1. Introduction

Seaweeds are sources of diverse bioactive compounds with potential therapeutic action. Among these compounds are sulfated polysaccharides that are involved in several cellular processes [1]. Sulfated polysaccharides are complex and heterogeneous polymers formed by repeated units of sugars that include sulfate groups [2]. These polymers are the major components of the extracellular matrix of seaweed and are recognized as having a great number of biological activities, including gastroprotective [3, 4], antioxidant [5], anticoagulant [6], antiviral [7], antithrombotic [8], antiproliferative [9], immunostimulatory [10], antitumor [11], anti-inflammatory, and anti-nociceptive actions [12]. Because of these features, these biomolecules are thought to have important applications and thus have attracted much attention for the potential development of new drugs.

Sulfated polysaccharides found in red seaweed are generally in the form of sulfated galactans [13], exhibiting a high molecular mass (≥ 100 kDa) and high electronegativity, which causes them to interact electrostatically with specific proteins, thereby contributing to their observed biological actions [14, 15]. Based on their stereochemistry, sulfated galactans mainly comprise agarans and carrageenans; however, other important chemical biomolecules, such as proteins and phenolic compounds, are also present [16]. Importantly, carrageenans share a common basic structure, consisting of a linear chain with alternating residues of 3-linked β -D-galactopyranose and 4-linked α -D-galactopyranose, with unit D occurring many times as its 3,6-anhydro- α -D-galactopyranosyl form [17]. The most common types of carrageenan are traditionally identified by Greek symbols, and the kappa (κ), iota (ι), and lambda (λ) types are considered the forms most important commercially [18, 19].

The red seaweed *Hypnea musciformis* represents a good source of natural carrageenans [20], a polymer of high economic value; this species is highly valued in the northeast coast of Brazil [21]. The chemical structure of the carrageenan produced by *H. musciformis* has been extensively described in the literature [22, 23, 24] and mainly consists of repetitions of 3-linked β -D-galactose-4-sulphate connected to 4-linked 3,6-anhydro- α -D-galactose. Thus, this polymer is named κ -carrageenan [25]. We have previously evaluated the therapeutic potential of a sulfated polysaccharide fraction (PLS) extracted from seaweed *H. musciformis* in animal models and found that it has anti-inflammatory effects [26]. Additionally, it has been found that PLS exerted a gastroprotective effect in ethanol-induced lesion models, evidencing gastrointestinal

modulatory effects [27]. These findings are indicative of its potential pharmacochemical action in other gastrointestinal disorders, such as diarrheal diseases. However, reports of the biological activity of sulphated polysaccharides in experimental models of diarrhea are rare.

Diarrhea is a clinical manifestation of many gastrointestinal diseases, and is responsible for millions of deaths annually, mainly amongst children under 5 years of age [28]. Since ancient times, diarrhea has been recognized as an important clinical problem, and it affects mainly socio-economically challenged populations in developing countries [29]. Diarrheal diseases are characterized by an increase in the number of bowel movements, three or more times per day, with a change in stool consistency accompanied by abdominal pain [30]. The physiological mechanisms leading to diarrheal disease include accelerated intestinal transit, increased amounts of fluid in the intestinal lumen, and decreased absorption of water and electrolytes [31]. Currently, the pharmacological treatment of diarrhea is non-specific, and is usually aimed at reducing the inconvenience caused by frequent bowel movements, dehydration, and discomfort [32, 29].

Considering that sulphated polysaccharides from seaweed have shown gastroprotective and gastrointestinal modulatory effects, this study aimed to evaluate the chemical composition and anti-diarrheal activity of PLS obtained from red seaweed (*H. musciformis*) in rodent models of acute, inflammatory, and secretory diarrhea, as well as to clarify the possible underlying mechanisms.

2. Materials and methods

2.1. Materials and chemicals

Papain was obtained from Merck (Kenilworth, NJ, USA). Cetylpyridinium chloride (CPC), castor oil, prostaglandin E₂ (PGE₂), cholera toxin (CT), and monosialoganglioside-GM1 were purchased from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA). Loperamide hydrochloride and naloxone hydrochloride were from Janssen–Cilag Pharmaceuticals LTD (Sao Paulo, Brazil) and CRISTÁLIA Pharmaceutical Chemicals LTD (Nova Itapira, Brazil), respectively. Sulfated atropine was obtained from Isofarma Industrial Farmacêutica LTD (Fortaleza, Brazil) and bethanechol chloride was purchased from Galen Manipulation Pharmacies[®] (Teresina, Brazil). Other reagents chemicals were of analytical grade and obtained from standard

commercial suppliers. All drugs were dissolved in saline or phosphate-buffered saline (PBS).

2.2. *Animals*

Rats (Wistar strain, 150–180 g) and mice (Swiss strain, 25–30 g) of both sexes were obtained from the Vivarium Sector of the Center for Research on Medicinal Plants, Federal University do Piauí. The animals were maintained in cages and kept at the laboratory at a temperature of $22 \pm 1^\circ\text{C}$ under a 12-h light/12-h dark cycle. The animals had free access to drinking water and a standard pellet diet. The experimental groups consisted of 5 to 6 animals per group (treatment with PLS, reference drug, and saline-treated control groups). The animals were deprived of food for 18–24 h before the experiments, but had free access to water. Experimental procedures and protocols used in this study were approved by the Ethics Committee in Research of the Federal University of Ceará (protocol no. 11/2013). All the procedures and animal care were conducted in strict accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

2.3. *Algal material and isolation of polysaccharides*

Samples of the red seaweed *H. musciformis* were collected at Flecheiras Beach, Trairi, Ceará, Brazil. A specimen was deposited at the Phycological Herbarium of the Marine Sciences Institute from the Federal University of Ceará-Fortaleza-CE, Brazil. The algae were thoroughly cleaned to eliminate any undesirable epiphytes attached to the thalli, washed with distilled water, and stored at -20°C . Carrageenan was extracted by proteolytic digestion [33]. The dried seaweed tissue (5 g) was ground in liquid nitrogen and suspended in 250 mL of 0.1 M sodium acetate buffer (pH 6.0) containing 510 mg papain, 5 mM ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA), and 5 mM cysteine, and was incubated at 60°C for 2 h. The residue was removed by filtration and centrifugation ($2700 \times g$ for 25 min at 4°C) and the sulphated polysaccharides were then precipitated by addition of 16 mL of 10% CPC. The mixture was centrifuged ($2700 \times g$ for 25 min at 4°C) and the polysaccharides (κ -carrageenan) in the pellet were washed with 250 mL of 0.05% CPC solution, dissolved in 175 mL of 2 M NaCl/absolute ethanol (100:15, v/v) solution, and precipitated with 300 mL absolute ethanol for 24 h at 4°C . After further centrifugation ($2700 \times g$; 4°C ; 25 min), the precipitate was washed

twice with 250 mL of 80% ethanol solution followed by washing with absolute ethanol. The precipitate was then dried with acetone under hot air flow (60°C).

2.4. Chemical analysis of PLS isolated from *H. musciformis*

The spectroscopical characterization of *H. musciformis* sulfated polysaccharide has been reported previously [22, 23, 24]. The total sugar content was determined by the sulfuric acid–UV technique [34], using D-galactose as standard. Protein content was measured by the Bradford method [35]. The amount of carbon in PLS was determined by elemental microanalysis (Perkin Elmer CHN 2400, Waltham, MA, USA). The sulfate content in the polysaccharide was determined by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry (ICP-OES). In this method, 12 mg of polysaccharide was digested in 3 mL of concentrated HNO₃ at 70°C for 1 h. After digestion and cooling of the solution, the volume was adjusted to 50 mL and the sulfur content was measured in an optical emission spectrometer with inductively coupled plasma (ICP Plasma Spectro Arcos, Cleve, Germany) at 180,731 nm [36].

2.5. Evaluation of anti-diarrheal efficacy of PLS from seaweed *H. musciformis*

2.5.1. Castor oil-induced diarrhea

Diarrhea was induced with castor oil according to a previously described method [37] with few modifications. Rats (Wistar strain, 150–180 g) were randomly allocated to 6 groups of 5–6 rats per group and were fasted for 18 h prior to the experiment, although they were allowed free access to water. The treatment groups were allocated as follows: Saline (group I), PLS 10, 30, and 90 mg/kg (groups II, III, and IV, respectively), loperamide, a standard anti-diarrheal agent, 5 mg/kg (group V), and vehicle-only (group VI). The treatments were administered by gavage. The PLS doses and route of administration were chosen according to Damasceno et al. [27] and previous studies of our research group. After 1 h of pretreatment, castor oil (10 ml/kg, *p.o.*) was administered to the experimental groups (groups I to V) for induction of diarrhea. Group VI received saline only. After the induction of diarrhea, the animals were placed in cages lined with adsorbent material for 3 h to detect the characteristics of diarrheal stools, including evaluation of the total number of stools (mg) and the total number of diarrheal stools (mg) excreted by each group. The efficacy of each treatment was expressed as percent inhibition (%) of diarrhea compared to the control group,

expressed as 100%. The inhibition percentage for defecation and diarrhea was calculated from the following expression:

$$\% \text{ Inhibition of defecation} = [(A - B) / A] \times 100,$$

where A represents the mean mass of defecation induced by castor oil; B represents the mean mass of defecation after treatment with drug or PLS from *H. musciformis*.

Furthermore, the severity of the castor-oil induced diarrhea was characterized according to the consistency of stools present in the perianal region of the animal as numerical scores (0–3). Scores were assigned as previously described [38]: 0 = normal stool (or lack of diarrhea); 1 = semi-solid stool; 2 = small/moderate amount of pasty stool; and 3 = large amount of watery stool.

2.5.2. Castor oil-induced intestinal fluid accumulation (enteropooling assay)

A measurement of castor oil-induced enteropooling was determined according to a method previously described [39], but with modifications. Rats (Wistar strain, 150–180 g) were deprived of food for 18 h before the experiment and randomly allocated to 5 groups of 5–6 animals per group. The control group (group I) received saline, while groups II, III, and IV received PLS (10, 30, and 90 mg/kg, respectively), and group V received loperamide (5 mg/kg). All test materials were administered by gavage. At 1 h after the pretreatment, all groups were treated with castor oil (10 ml/kg, *p.o.*). At 3 h after induction of diarrhea, the rats were euthanized by cervical dislocation, laparatomized, and the small intestine (from the pylorus to the caecum) was isolated and removed. The intestinal contents were measured in a graduated tube. The activity of each treatment was expressed as percent inhibition (%) of the volume of intestinal fluid and was calculated using the following expression:

$$\% \text{ Inhibition of the volume of intestinal fluid} = [(A - B) / A] \times 100,$$

where A represents the mean volume of fluid after castor oil administration, and B represents the mean volume of fluid after treatment with drug or PLS from *H. musciformis*.

2.5.3. Determination of Na⁺/K⁺-ATPase activity in small intestine

Before the experiments, mice (Swiss strain, 25–30 g) were deprived of food for 18 h, but had free access to water. Castor oil was used to induce diarrhea as described in section 2.5.1. At first, the control group (group I) received saline, while group II received PLS (90 mg/kg, *p.o.*), group III received loperamide (5 mg/kg, *p.o.*), and group

IV received vehicle only. After 1 h of pretreatment, castor oil (10 ml/kg *p.o.*) was administered to the experimental groups (groups I to III). After 3 h, the mice were euthanized by cervical dislocation, laparatomized, and the small intestine (from the pylorus to the caecum) removed to evaluate the activity of the enzyme Na⁺/K⁺-ATPase present in intestinal enterocytes, using the procedure described in [40], with modifications. Briefly, samples of the 3 intestinal segments were homogenized in 200 mM NaCl, 40 mM KCl, and 60 mM Tris (pH 7.4). Aliquots of 20 µL of intestinal supernatant were mixed with 20 µL of 80 mM de MgCl₂.6H₂O, 20 µL of 20 mM de EGTA, and 240 µL of distilled water. The tubes were incubated at 37° C for 5 min. Then, 100 µl of 8 mM ATP was added, the samples mixed thoroughly, and incubated at 37°C for 30 min. Next, 200 µL of 5% sodium dodecyl sulfate (SDS), together with 2,000 µL of Splittgerber's reagent (ammonium molybdate/sulfuric acid solution) and 9% ascorbic acid, in a ratio of 4:1 (v/v) were added, and the samples were incubated for 30 min at room temperature to allow color development. Blank samples were prepared with 20 µL of distilled water instead of small intestine supernatant. The absorbance of samples was measured at 560 nm on a spectrophotometer. The concentration of inorganic phosphate in the tissue was validated from a calibration curve obtained with known concentrations of inorganic phosphate. The activity of the enzyme Na⁺/K⁺-ATPase was standardized in terms of the protein concentration in samples of small intestine tissues, by using standard procedures, according to the manufacturers' instructions (Labtest Diagnostica, Lagoa Santa, Brazil). Thereafter, the activity of Na⁺/K⁺-ATPase was calculated using the following equation:

Specific activity (µmole Pi·mg protein⁻¹·h⁻¹) = [Pi] × 2 × dilution factor / 1000 × protein concentration (mg/mL),

where [Pi] represents the concentration of inorganic phosphate in nmoles (obtained from the calibration curve); 2 represents the factor introduced to obtain the amount of Pi released per h; 1000 represents the factor introduced to convert the Pi released to µmoles.

2.5.4. Gastrointestinal transit test (charcoal meal)

Gastrointestinal transit was measured using the charcoal propulsion test as described [38]. In the first series of experiments, the effect of PLS in reducing gastrointestinal motility in the castor oil-induced diarrhea model was evaluated. Mice (Swiss strain, 25–30 g) were randomly divided into 3 groups of 6 animals each. The

animals were starved for 18 h prior to the test, but were allowed water *ad libitum*. All groups received castor oil (10 mL/kg *p.o.*) to induce diarrhea, and 30 min later, they were treated orally with saline (group I), PLS (90 mg/kg; group II), or loperamide (5 mg/kg; group III). One hour after the last drug administration, all animals received a charcoal meal (0.2 mL of 10% activated charcoal suspended in 5% gum acacia) by gavage. Twenty minutes later, all animals were euthanized, and the distance covered by the charcoal meal (marker) in the intestine from the pylorus to the caecum was measured and expressed as the percentage of distance covered:

$$\% \text{ Distance covered by marker} = [A / B] \times 100,$$

where A represents the mean of the distance traveled by the charcoal meal and B represents the mean total length of the intestinal segment.

In the second series of experiments, to examine the involvement of opioid receptors in the effect of PLS in reducing gastrointestinal transit in the castor oil-induced diarrhea model, mice were divided into 3 groups (6 mice/group) and all received naloxone (2 mg/kg, *s.c.*; an opioid antagonist). After 30 min, mice received saline (group IV), PLS (group V), or loperamide (group VI; an opioid agonist) in the same dose administered to groups I, II, and III, respectively. The subsequent steps were performed as described above.

Furthermore, to evaluate possible anticholinergic activity of PLS in reducing gastrointestinal transit, the gastrointestinal transit model stimulated by bethanechol, a cholinergic agonist [41], was used. Mice were randomly divided into 4 groups (6 mice/group) and pretreated orally with saline (group VII), PLS (90 mg/kg, *p.o.*; group VIII), or atropine (3 mg/kg, *s.c.*; group IX; cholinergic antagonist). After 30 min, groups VII to IX received bethanechol (3 mg/kg, *i.p.*). Group X received saline only (vehicle control). One hour afterwards, all animals received a charcoal meal (0.2 mL of 10% activated charcoal suspended in 5% gum acacia) by gavage. Twenty minutes later, all animals were euthanized, and the distance covered by the charcoal meal in the intestine (from the pylorus to the caecum) was measured and expressed as described above.

2.5.5. PGE₂-induced intestinal enteropooling

As previously described [42], rats (Wistar strain, 150–180 g) were deprived of food for 18–24 h before the experiment. Animals were divided into 4 groups of 5–6 animals each. Group I received saline intraperitoneally (control group), while group II received PLS (90 mg/kg) and group III received loperamide (5 mg/kg) by gavage.

Immediately after drug administration, all the groups were administered PGE₂ (100 µg/kg) by gavage for induction of diarrhea, except for group IV, which received saline only (vehicle control). At 30 min after administration of PGE₂, each animal was euthanized and the small intestine (from the pylorus to the caecum) resected; the intestinal contents were collected and its volume was measured. The efficacy of each treatment was expressed as percent inhibition (%) of the volume of intestinal fluid and was calculated as for the castor oil-induced enteropooling model described above.

2.5.6. CT-induced fluid secretion in intestinal closed loops

The effect of the PLS on CT-induced intestinal fluid secretion was evaluated with intestinal closed loops, as previously described [43]. Mice were fasted for 24 h before the experiment, but with access to water *ad libitum*. The animals were randomly divided in 3 groups (6 mice each) and pretreated orally by gavage with saline (2.5 mL/kg) in the negative- (Group I) and positive-control groups (Group II), while the test group (Group III) received PLS (90 mg/kg). One hour later, the animals were anesthetized with a mixture of xylazine hydrochloride (5 mg/kg) and ketamine (60 mg/kg), injected intraperitoneally. Then, a median laparotomy of 1–2 cm was performed for visualization of the small intestine. After exposure of the small intestine, a closed loop (2–3 cm in length) in the medial portion of the jejunum was isolated by double ties. Subsequently, a volume of 100 µL of PBS (Group I), or CT dissolved in PBS at a dose of 1 µg/loop (Groups II and III) was injected into the closed loop. The intestinal loops were repositioned into the abdominal cavity, the surgical incision was sutured and the mice were allowed to recover from anesthesia. During the procedure, the body temperature was maintained at 36–38° C. Four hours after anesthesia, the mice were euthanized, the abdominal cavity (skin and peritoneum) was opened, and the closed loops were exteriorized for measurements of intestinal fluid secretion (g/cm) in terms of loop weight/length ratios. The intestinal fluid accumulated in each closed loop was collected to measure the concentration of chloride (Cl⁻) ions.

2.5.7. Determination of chloride ion concentration in CT-induced intestinal fluid secretion

Samples of fluid accumulated in each intestinal closed loop were collected and centrifuged at 4000 × g for 10 min. The concentration of Cl⁻ ions was determined using

a Labtest® kit, as recommended by the manufacturer. The absorbance was measured at 470 nm in a spectrophotometer. Values obtained were expressed in mEq/L.

2.5.8. Evaluation of intestinal fluid absorption in closed loops

To study the effect of PLS on intestinal fluid absorption, we followed a method previously described [43]. Mice were given access to water, but not to food, for 24 h. Intestinal loops were isolated as described in section 2.5.6. Subsequently, loops were injected with 200 μ L of PBS (negative control; Group I), PBS containing 10 mM glucose (positive control for fluid absorption; Group II), or PBS containing PLS (90 mg/kg; Group III). The intestinal loops were repositioned into the abdominal cavity, the surgical incision was sutured, and the mice were allowed to recover from anesthesia. Thirty minutes after inoculation of the loops, the mice were euthanized, the abdominal cavity (skin and peritoneum) was opened and closed loops were exteriorized. The difference between the weight of the loop containing fluid and without fluid was calculated. The percentage of fluid absorption was quantified indirectly as the loop weight/length ratio.

2.5.9. GM1 ganglioside-dependent ELISA

Different concentrations of PLS obtained from *H. musciformis* were analyzed for GM1 receptor-binding activity in a GM1-ganglioside enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as described [44]. The microtiter plates (Global Plast, Plantelimon, Romania) were coated with monosialoganglioside GM1 (2 μ g/mL) diluted in 1% PBS (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA), at 100 μ L per well, overnight at room temperature. The remaining sites were blocked with 200 μ L/well of 1% w/v bovine serum albumin (Sigma–Aldrich) in PBS for 30 min, at 37°C. After each step, the wells were washed 3 times with PBS containing 0.05% v/v Tween 20 (wash step). Samples containing 100 ng CT (Sigma–Aldrich) without or with different concentrations of PLS (1 to 500 μ g/mL) were serially diluted and added to the wells and incubated at room temperature for 2 h. ELISAs were carried out using rabbit anti-CT antibody (Sigma–Aldrich) diluted 1:2000 in PBS, at room temperature for 1 h. After washing, the plates were incubated with goat anti-rabbit immunoglobulin G conjugated to horseradish peroxidase produced (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) diluted 1:2000

in PBS, at room temperature for 1 h. The microtiter plate was shaken on a plate shaker during incubations with CT and the antibody solutions. Then, 100 μ L of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (Sigma–Aldrich) was added to the wells after a washing step, following by a 15-min incubation at room temperature. The color intensity was measured at 492 nm in an ELISA reader (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Each experiment was carried out in triplicate and validated against a standard curve of dilutions of known concentrations (100 to 1.56 ng/mL) of CT used to estimate the amount of CT in the samples. For negative controls, wells were incubated without GM1.

2.6. Data and statistical analysis

The data were expressed as mean \pm SEM. Results from saline-treated control animals were used as baseline values. The results obtained from PLS or reference drug-treated test groups were compared with those obtained from saline-treated controls. The experiments *in vitro* data represent the mean \pm SEM from independent triplicate samples. All statistical analyses were performed with GraphPad Prism (version 5.0) software. The statistical significance of the differences between groups was determined by one-way analysis of variance (ANOVA) and the multiple comparison Student–Newman–Keuls test. The fluidity of feces was analyzed using the Kruskal–Wallis nonparametric test, followed by a multiple comparisons Dunn's test. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Chemical analysis of *H. musciformis* polysaccharide

The polysaccharide of *H. musciformis* was obtained by aqueous extraction with proteolytic digestion under heating. This resulted in a yield of 31.8% of the algal dry weight. The total carbohydrate content accounted for $99 \pm 2\%$ of the sample and no protein residues were found in the colorimetric assay performed. The %S was $5.08 \pm 0.08\%$ and the %C was $25.98 \pm 0.29\%$. The degree of substitution of sulfate (DS sulfate) was 0.88 ± 0.02 , based on the equation described by Melo et al. [45].

$$DS = (\%S / \text{atomic mass of S}) / (\%C / \text{atomic mass of C} \times 12) = 4.5 (\%S / \%C)$$

3.2. PLS reduces castor oil-induced diarrhea

The administration of castor oil significantly induced diarrhea, with decreased stool consistency. However pretreatment of rats with PLS at all tested doses (10, 30, and 90 mg/kg), significantly (all $P < 0.05$) reduced the total number stools (22.25 ± 0.008 g; 46.68% inhibition; 26.93 ± 0.007 g; 35.46% inhibition; 17.10 ± 0.008 g; 59.02% inhibition, respectively), as compared to the castor oil group (41.73 ± 0.005 g). PLS decreased the total number of diarrheal stools, thereby controlling the frequency of diarrhea (50.82%; 46.83%; and 63.16% of inhibition, respectively), as compared to the control (group I, Table 1). In terms of the severity of diarrhea, PLS at the 3 tested doses significantly (all $P < 0.05$) decreased the general diarrhea score, including the hard, mild, and copious stools, in comparison to the control treatment (group I, Fig. 1). Loperamide (5 mg/kg, *p.o.*), the standard anti-diarrheal drug, was also able to reduce the total number of stools (0.240 ± 0.011 g; 99.42% inhibition), total number of diarrheal stools (0.240 ± 0.011 g; 99.37 %), and the severity of diarrhea significantly ($P < 0.05$), as compared to the castor oil group.

3.3. PLS reduces castor oil-induced intestinal fluid accumulation in the enteropooling assay

The enteropooling assay was used to evaluate the intestinal fluid accumulation during the diarrheal process. Administration of PLS (90 mg/kg) significantly ($P < 0.05$) inhibited castor oil-induced intestinal fluid accumulation in rats (43.31% inhibition) compared to the control group. Thus, considering that the dose of 90 mg/kg afforded the best anti-diarrheal effect, this dose was selected as the standard for the subsequent experiments. Loperamide also significantly inhibited intestinal fluid accumulation, by 44.82% of inhibition (Table 2).

3.4. PLS increases $Na^+ K^+$ ATPase activity in small intestine

Our results showed that castor oil reduced the activity of the enzyme Na^+/K^+ -ATPase ($432.00 \pm 54.57 \mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) significantly ($P < 0.05$, Fig. 2) compared to treatment with saline only ($1158.00 \pm 154.00 \mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$). However, the activity of Na^+/K^+ -ATPase increased significantly ($P < 0.05$) in the small intestines of animals pretreated with PLS ($1431.00 \pm 384.1 \mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) as compared with the castor oil group. Loperamide ($736.10 \pm 80.14 \mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) also increased the activity of the enzyme, although to a somewhat smaller extent. These results indicate that treatment

with PLS was able to increase the activity of the enzyme, emphasizing its anti-diarrheal activity.

3.5. Effect of PLS in reducing gastrointestinal transit: participation of opioid and anticholinergic mechanisms

The gastrointestinal distance traveled by a charcoal meal through the intestine after the ingestion of castor oil was used to evaluate the effect of PLS on gastrointestinal transit. Animals treated with PLS or loperamide (groups II and III) showed a significant ($P < 0.01$) inhibition in the gastrointestinal transit of the meal (53.725% and 38.700%, respectively), compared to the saline-treated group (group I). Additionally, in the second series of experiments, we administered a non-specific opioid antagonist, naloxone, to investigate the possible involvement of opioid receptors. Pretreatment with the antagonist did not impair the effects of PLS treatment (group V, 52.884% inhibition), although it prevented the activity of loperamide (group VI, 1.902% inhibition), a standard drug used for treatment of diarrhea, which alters intestinal transit by interacting with opioid receptors throughout the gut (Fig. 3).

In the bethanechol-stimulated gastrointestinal transit model, we found that this cholinergic agonist significantly increased the percentage of distance traveled by a charcoal meal in the intestine ($P < 0.01$) compared to treatment with saline only ($80.900 \pm 7.170\%$ vs $52.830 \pm 3.187\%$, respectively). Animals pretreated with PLS (group VIII) showed a significant ($P < 0.001$) reduction in gastrointestinal transit (42.913%), as did atropine (group IX, 43.410% inhibition), a cholinergic antagonist, as compared to the saline-treated group (group VII). These results show that PLS reversed the stimulatory effect exerted by bethanechol on gastrointestinal transit (Fig. 4) suggesting a possible anticholinergic activity of PLS in reducing gastrointestinal transit in mice.

3.6. PLS reduces PGE₂-induced intestinal enteropooling

Another model for the evaluation of diarrhea uses PGE₂ induction. Our results showed that administration of PGE₂ significantly ($P < 0.001$) increased the intestinal fluid volume compared to treatment with saline only (1.825 ± 0.193 ml vs 0.420 ± 0.165 ml, respectively). However, the group pretreated with PLS, compared to the PGE₂ group, had an average volume of intestinal fluid of 0.900 ± 0.230 ml representing an

inhibition of 50.684% and the results were similar to those in the group treated with loperamide (0.960 ± 0.040 ml of intestinal fluid, 47.397% inhibition). This inhibition was statistically significant ($P < 0.05$, Table 3). The results indicate that treatment with PLS was able to reduce the intestinal fluid accumulation in enteropooling induced by PGE₂, and demonstrates that the PLS fraction is efficacious in inflammatory diarrhea.

3.7. PLS inhibits the secretion of intestinal fluid in CT-treated closed loops

The antisecretory efficacy of PLS was examined using CT-induced secretion of intestinal fluid in a closed-loop model. As seen in Fig. 5A and B, there was significant accumulation of fluid (loop weight/length ratio) and distention in the loops injected with CT (0.147 ± 0.016 g/cm) in the positive-control group, compared to the negative control group, where the loops were injected with PBS (0.058 ± 0.007 g/cm). However, pretreatment with PLS (0.069 ± 0.012 g/cm; 53% inhibition) significantly reduced ($P < 0.001$) the CT-induced intraluminal fluid accumulation compared to the positive-control group. Thus, PLS was effective in reducing the intestinal secretion of fluid, significantly reversing the biological activity of CT in the small intestine.

3.8. PLS reduces the Cl⁻ concentration in intestinal fluid

To determine the contribution of PLS to the inhibition of effects mediated by CT in a model of secretory diarrhea, we analyzed the concentration of Cl⁻ in the intestinal fluid accumulated in each closed loop. The concentration of Cl⁻ was significantly ($P < 0.001$) higher in intestinal loops injected with CT (156.5 ± 14.51 mEq/L) than in loops injected only with PBS (16.44 ± 8.52 mEq/L). The Cl⁻ levels were significantly decreased ($P < 0.001$) in the intestinal contents of the animals pretreated with PLS (70.63 ± 17.82 mEq/L), as shown in Fig. 5C. These data indicate that PLS reduces the influx of these ions into the intestinal lumen during severe cholera diarrhea.

3.9. Effect of PLS on the absorption of intestinal fluid

The effect of PLS on intestinal fluid absorption was studied in closed intestinal loops that had been injected with 200 μ L of PBS, glucose, or PLS. Fig. 5D shows intestinal fluid absorption in the positive control for this model, PBS containing 10 mM glucose ($83.90 \pm 7.04\%$), as compared to the negative-control group ($39.67 \pm 7.34\%$). Intraluminal injection of PLS ($42.00 \pm 6.15\%$) in the closed intestinal loops had no effect on intestinal fluid absorption, which was significantly different from that in the

glucose group. Thus, treatment with PLS decreased the CT-induced secretion of intestinal fluid by another mechanism.

3.10. PLS interacts with the GM1 receptor and blocks binding of CT

The possibility that PLS could block the binding of CT to the GM1 receptor was tested using an ELISA in which GM1 was first incubated with PLS, washed, and then incubated with CT. We observed a significant decrease ($P < 0.001$) in the binding of CT to the GM1 receptor after pre-incubation with PLS (Fig. 6, column b). Similar findings were dose-dependently obtained when PLS was co-incubated with CT in the microtiter plate previously coated with GM1 (Fig. 6, column c to h). The amount of detectable CT was decreased significantly ($P < 0.001$) with all concentrations of PLS. Therefore, these findings suggest that PLS interacts with the GM1 receptor to prevent the binding of CT.

4. Discussion

In the present study, PLS from the seaweed *H. musciformis* was extracted and subsequently subjected to chemical analysis. The recovery of κ -carrageenan from red seaweeds can vary depending on the species and extraction procedure. For *H. musciformis*, Cosenza et al. [22] described yields of 5.5% for extraction at room temperature and 39.4% when the algal powder was heated at 90°C, both followed by precipitation with 3.5 volumes of isopropanol. Despite the higher yield of the latter method, the authors reported high quantities of protein contaminants, as much as 6.4%. Polysaccharides were also obtained from *H. musciformis* by Arman and Qader [23]. In that study, κ -carrageenans were extracted in aqueous, alkaline, and acidic solutions. The yields varied from 4.3 for acidic media to 30.2 for aqueous solution and 39.8 for alkaline media. Considering that no protein residues were found in the colorimetric assay performed, these data indicated the absence of significant amounts of impurities in the PLS of *H. musciformis*, indicating that it is adequate for pharmacological investigation. Moreover, the DS sulfate was calculated, based on the equation described by Melo et al. [45], which defines the DS sulfate by the number of OSO_3^- or sulfur atoms per disaccharide repeating unit (possessing 12 carbon atoms). PLS possesses approximately 1 sulfate group per disaccharide unit and this is in total accordance with data for other κ -carrageenans [46, 47].

The use of natural products for the treatment of diarrheal diseases is a common practice in folk medicine all over the world. Clinically, for a drug to be considered anti-diarrheal, it should reverse the diarrhea; that is, it must reduce motility in the intestinal tract, reduce the secretion of fluid, and increase the absorption of water [48]. Our study clearly demonstrated that PLS from the red seaweed *H. musciformis* has an anti-diarrheal activity in rodents, as evidenced in experimental models of castor oil and inflammatory PGE₂-induced acute diarrhea in rats, as well as in gastrointestinal transit and in the CT-induced secretory diarrhea model in mice.

It has been described in the literature that castor oil is an effective laxative, widely used to study the symptoms associated with diarrhea and motility in intestinal transit. The diarrhea induced by castor oil is attributable to its active principle, ricinoleic acid [49]. In the intestinal lumen, castor oil is hydrolyzed by lipase to ricinoleic acid, an irritant of the intestinal mucosa that interacts with several endogenous mediators and induces diarrhea [50, 51]. Castor oil induces synthesis and release of prostaglandins [52], platelet-activating factor (PAF) [53], and nitric oxide [54, 55, 56], which mediates the secretion of electrolytes into the small intestine associated with stimulation of smooth muscle motility. The activation of tachykinin receptors by castor oil can release PAF and nitric oxide, contributing to its laxative effect [57]. Castor oil increases the secretion of fluid, via adenylate cyclase, and increases the levels of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) [48]. Moreover, it reduces the activity of Na⁺/K⁺-ATPase in the small intestine and colon, preventing the reabsorption of Na⁺ and K⁺ [51]. Therefore, various factors are involved in induction of diarrhea by castor oil and compounds that reverse this form of diarrhea are probably capable of inhibiting the biosynthesis of these factors or mediators.

In our study, PLS at the 3 doses tested significantly reduced the severity of castor oil-induced diarrhea and the total amount of stool and diarrheal stools, thus inhibiting defecation as well as diarrhea. This effect suggests that PLS may inhibit some mediators involved in the mechanism of action of castor oil, which involves changes in intestinal motility, increases in the permeability of the mucosal cells, and changes in electrolyte transport.

Another important factor involved in the diarrheal process is intraluminal fluid accumulation, mainly water and electrolytes, which we studied using an enteropooling assay in castor oil-induced diarrhea. PLS significantly reduced the volume of the intestinal contents compared to control treatment. The prevention of accumulation of

intraluminal fluid by PLS may be due to promotion of an antisecretory mechanism associated with water and electrolyte transport across the intestinal mucosa, which are known to be altered in diarrheic conditions. This anti-enteropooling effect of the extracts of leaves of *Desmodium pulchellum* and roots of *Aconitum heterophyllum* in rats was better than that reported in previous studies [58, 59].

The enzyme Na^+/K^+ -ATPase is present in the basolateral membrane of the small intestinal enterocytes and provides the driving force for the active transport of many electrolytes [60, 61]. Inhibition of this intestinal enzyme may be critical to regulation and absorption of Na^+ and K^+ in the intestine, and may lead to intestinal fluid accumulation, thereby contributing to diarrhea [62, 63, 64]. We show a notable increase in the activity of Na^+/K^+ -ATPase in the small intestine of mice pretreated with PLS, as compared to treatment with control, in castor oil-induced diarrhea. Therefore, we suggest that this effect may be one of the mechanisms by which PLS exerts its anti-diarrheal activity. However, this hypothesis does not exclude the possibility of other mechanisms by which the PLS can act as anti-diarrheal agent. Moreover, the increase in the activity Na^+/K^+ -ATPase in the present study by PLS can contribute to the anti-enteropooling effect, by decreasing the intestinal fluid accumulation. The enhancement of the activity of this intestinal enzyme by PLS was larger than that produced by loperamide, the reference drug.

Another physiological mechanism that contributes to diarrhea includes accelerated intestinal transit. In this study, we assessed the influence of PLS on gastrointestinal transit in mice, using activated charcoal as a marker of the maximum distance traveled in the gut. This method is a suitable preclinical model for analyzing the effects of the test drugs on gastrointestinal motility [65, 66]. Our results showed that PLS significantly reduced gastrointestinal transit in the castor oil-induced model, as compared to treatment with control, as evidenced by the decrease in the distance traveled by charcoal meal. These results are important in the control of diarrhea, since this effect contributes to a reduction in the number of evacuations and the increase in the absorption of water and electrolytes, causing a delay in the passage of gastrointestinal contents, thereby further retarding movement through the colon [67].

To characterize the mechanism involved in the inhibitory effect of PLS on gastrointestinal transit, we tested some pharmacological agents that have different mechanisms of action. Naloxone, an opioid antagonist, was used to clarify whether the anti-diarrheal activity was associated with the opioid receptors present in the intestine.

We observed that naloxone significantly prevented the effect of loperamide, the standard opioid agonist. However, naloxone was not able to antagonize the effect exerted by PLS significantly. Thus, the anti-diarrheal activity of the PLS is not dependent on an opioid mechanism and PLS delays the gastrointestinal transit by other mechanisms that modulate gastrointestinal motility. Therefore, we investigated the possible anticholinergic activity of PLS in reducing the gastrointestinal transit induced by bethanechol. Pharmacological studies with selective muscarinic receptor subtype antagonists have indicated that bethanechol is a cholinomimetic agonist that stimulates intestinal muscle contractility by activating cholinergic muscarinic-3 receptors throughout the gastrointestinal tract [68]. In our study, PLS significantly blocked the stimulatory effects of bethanechol, suggesting that it possibly inhibits intestinal motility via an anticholinergic mechanism, pharmacologically acting as an antagonist of muscarinic receptors. This action was similar to that displayed by atropine, the cholinergic antagonist used as the reference drug.

Another model that is used to evaluate diarrhea is the PGE₂-induced model, which differs from other models in that it induces inflammation. PGE₂ is a proinflammatory mediator, a product of cyclooxygenase (COX) metabolism, which can cause vasodilation, as well as can act synergistically with inflammatory vasodilators [69]. It plays a significant role in the physiology and pathophysiology of the digestive system [70]. PGE₂ is widely distributed in the smooth muscle layers of the small intestine [71], affecting water and electrolyte transport as well as intestinal motility, through interacting with at least the cell-surface prostaglandin type E receptors (EP1, EP2, EP3, and EP4) [72]. In our study, PLS significantly inhibited PGE₂-induced intestinal fluid accumulation. These observations suggest that PLS inhibits the actions of PGE₂ in the gut. Another study has shown that *H. musciformis* has anti-inflammatory effects in an acute inflammation model [26]; however, the role of *H. musciformis* in reducing PGE₂-mediated inflammation has not previously been observed, and should be further investigated.

The anti-diarrheal effect of PLS in experimental models was similar to that produced by loperamide, used as reference drug in our study. It has been reported that the action of loperamide is predominantly mediated by μ -opioid receptors in the gut [73]. The therapeutic effect of loperamide is due to a reduction in the transit velocity and the increased of the capacity of the intestines to retain fluid [74].

Furthermore, we used a CT-induced model of diarrhea to investigate the possible intestinal anti-secretory activity of PLS. CT contains 5 B subunits, responsible for binding to the cellular glycosphingolipid–ganglioside–GM1 receptor, which has an active (A1) subunit and a bridging piece (A2) that links A1 to the 5B subunits [75]. After binding of the toxin to the cell receptor, CT is taken up into the human intestinal cells via receptor-mediated endocytosis. The toxin follows retrograde transport into the endoplasmic reticulum (ER), where it is released and the A1 domain secreted into the cytosol [76]. Once in the cytosol, A1 ADP-ribosylates the G protein G α . Upon ADP-ribosylation, G α remains in its active form and continuously stimulates adenylate cyclase, resulting in a substantial increase in intracellular concentration of cAMP, followed by PKA-mediated phosphorylation of the major chloride channel of intestinal epithelial cells, i.e., the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) [77]. The net increase in Cl $^-$ secretion is accompanied by osmotic movement of a large amount of water into the intestinal lumen, causing the severe diarrhea characteristic of cholera [78]. Our results demonstrated that PLS had an inhibitory effect on CT-induced fluid secretion in intestinal closed loops, reducing both the fluid and the concentration of Cl $^-$ in the intestinal lumen. Therefore, PLS may have potential application in the treatment of cholera. Given these data, we investigated whether the involvement of PLS in reducing fluid accumulation depends on mechanisms related to the absorption process, but found that PLS had no effect on intestinal fluid absorption in closed loops, clearly indicating that PLS acts by other mechanisms to reduce fluid loss.

Currently, there is no specific treatment for reducing the severity and duration of diarrhea induced by CT, although oral rehydration solutions (ORS) can effectively aid recovery from dehydration and loss of electrolytes [44]. Antibacterial drug therapy is limited, because it has no effect on the spread of cholera toxin and contributes to increasing antimicrobial resistance. Moreover, anti-motility agents are unsuitable in severe diarrhea because they may cause pooling of large fluid volumes in paralyzed bowel loops. Since the binding of CT to the receptor in the small intestine constitutes the primary step for the development of massive secretory diarrhea caused by *Vibrio cholera* infection, the binding of CT to GM1 is an attractive target for developing drugs that can block the function of the toxin [79]. Based thereon, we screened for possible interaction between PLS and the GM1 receptor, which could block CT binding. We demonstrate that PLS blocks the binding of CT to GM1 when PLS was added simultaneously with or prior to CT. Thus, inhibition of the CT–GM1 interaction by PLS suppresses the events that correlate with the pathophysiology of CT-induced diarrhea.

Previous studies reported that ganglioside receptors exhibit high affinity for carbohydrates, since CT can assume the form of a glycomimetic, enabling it to bind to a

multitude of ganglioside receptors on the host epithelium, with a greater affinity for GM1 [80]. This was supported by the development of GM1 receptor antagonists from galactose derivatives, where a prototype m-nitrophenyl-galactoside (MNPG) acted as a high-affinity inhibitor of CT–GM1 interaction [79]. According to previous studies [21], PLS from red seaweed comprises high-molecular-weight sulfated galactans, with high sugar content; galactose accounts for the majority of the sugars [80]. Furthermore, the total carbohydrate content of the PLS used in this study accounts for 99% of the sample. These assumptions can justify the interaction of PLS with GM1, preventing CT binding, which interferes in the key step of transport of the toxin into the enterocytes. These results were similar to those recently reported [81] for cashew gum, a complex heteropolysaccharide containing 73% galactose. Therefore, the direct influence of PLS on the pathophysiology may offer a promising alternative control strategy or prophylactic for cholera.

5. Conclusions

In conclusion, the results obtained in this study suggested that the PLS from red seaweed (*H. musciformis*) possesses anti-diarrheal activity in rodents by inhibiting typical fecal parameters, enteropooling, stimulation of Na^+/K^+ -ATPase activity in the enterocytes of the small intestine, and reduction of gastrointestinal motility, possibly via an anticholinergic mechanism. In addition, PLS was effective in inhibiting PGE_2 -induced inflammatory diarrhea and CT-induced secretory diarrhea, probably via the reduction of CT–GM1 receptor binding. These observations indicate that PLS can form the basis for discovery and development of new compounds of medicinal value for diarrheal diseases. However, further tests are needed to evaluate other parameters for the anti-diarrheal action of PLS. Since studies investigating the effect of sulfated polysaccharide extracted from seaweeds in experimental models of diarrhea are limited, this research forms the basis for new strategies for the treatment of diarrheal diseases.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest to disclose.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support from the National Council of Technological and Scientific Development - CNPq (Brazil) and Research foundation for the state of Piauí - FAPEPI. This work forms part of the requirements for obtaining a Master of Science degree in Biotechnology, Federal University of Piauí, by one of the authors (N. A. Sousa).

References

- [1] F. Han, W. Yao, X. Yang, X. Liu, X. Gao, Experimental study on anticoagulant and antiplatelet aggregation activity of a chemically sulfated marine polysaccharide YCP, *Int. J. Biol. Macromol.* 36 (2005) 201–207.
- [2] G. Jiao, G. Yu, J. Zhang, H.S. Ewart, Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae, *Mar. Drugs.* 9 (2011) 196-223.
- [3] R.O. Silva, A.P.M. Santana, N.S. Carvalho, T.S. Bezerra, C.B. Oliveira, S.R.B. Damasceno, L.S. Chaves, A.L.P. Freitas, P.M.G. Soares, M.H.L.P. Souza, A.L.R. Barbosa, J.V.R. Medeiros, A sulfated-polysaccharide fraction from seaweed *Gracilaria birdiae* prevents naproxen-induced gastrointestinal damage in rats, *Mar. Drugs.* 10 (2012) 2618-2633.
- [4] 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.V.R. Medeiros, Sulfated-Polysaccharide fraction from red algae *Gracilaria caudata* protects mice gut against ethanol-induced damage, *Mar. Drugs.* 9 (2011) 2188-2200.
- [5] T. Barahona, N.P. Chandía, M.V. Encinas, B. Matsuhira, E.A. Zúñiga, Antioxidant capacity of sulfated polysaccharides from seaweeds. A kinetic approach, *Food Hydrocolloid.* 25 (2011) 529–535.
- [6] N. Li, W. Mao, M. Yan, X. Liu, Z. Xia, S. Wang, B. Xiao, C. Chen, L. Zhang, S. Cao, Structural characterization and anticoagulant activity of a sulfated polysaccharide from the green alga *Codium divaricatum*, *Carbohydr. Polym.* 121 (2015) 175–182.
- [7] Y. Ohta, J. Lee, K. Hayashi, T. Hayashi, Isolation of sulfated galactan from *Codium fragile* and its antiviral effect, *Biol. Pharm. Bull.* 32 (2009) 892–898.
- [8] R.J.C. Fonseca, G.R.C. Santos, P.A.S. Mourão, Effects of polysaccharides enriched in 2,4-disulfated fucose units on coagulation, thrombosis, and bleeding. Practical and conceptual implications, *Thromb. Haemost.* 102 (2009) 829–836.
- [9] L.S. Costa, G.P. Fidelis, S.L. Cordeiro, R.M. Oliveira, D.A. Sabry, R.B.G. Câmara, L.T.D.B. Nobre, M.S.S.P. Costa, J. Almeida-Lima, E.H.C. Farias, E.L. Leite, H.A.O. Rocha, Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds, *Biomed. Pharmacother.* 64 (2010) 21–28.
- [10] X.Q. Zha, C.Q. Lu, S.H. Cui, L.H. Pan, H.L. Zhang, J.H. Wang, J.P. Luo, Structural identification and immunostimulating activity of a *Laminaria japonica* polysaccharide, *Int. J. Biol. Macromol.* 78 (2015) 429–438.

- [11] P. Shao, X. Chen, P. Sun, In vitro antioxidant and antitumor activities of different sulfated polysaccharides isolated from three algae, *Int. J. Biol. Macromol.* 62 (2013) 155–161.
- [12] L.S. Chaves, L.A.D. Nicolau, R.O. Silva, F.C.N. Barros, A.L.P. Freitas, K.S. Aragão, R.A. Ribeiro, M.H.L.P. Souza, A.L.R. Barbosa, J.V.R. Medeiros, Antiinflammatory and antinociceptive effects in mice of a sulfated polysaccharide fraction extracted from the marine red algae *Gracilaria caudate*. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 35 (2012) 93-100.
- [13] E. Percival, R.H. McDowell, Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides, Academic Press, New York, 1967.
- [14] F.R.F. Silva, C.M.P.G. Dore, C.T. Marques, M.S. Nascimento, N.M.B. Benevides, H.A.O. Rocha, S.F. Chavante, E.L. Leite, Anticoagulant activity, paw edema and pleurisy induced carrageenan: action of major types of commercial carrageenans, *Carbohydr. Polym.* 79 (2010) 26–33.
- [15] A.I. Usov, S.V. Yarotsky, A.S. Shashkov, Carbon-13 NMR spectroscopy of red algal galactans. *Biopolymers* 19 (1980) 977–990.
- [16] S. Mohamed, S.N. Hashim, H.A. Rahman, Seaweeds: A sustainable functional food for complementary and alternative therapy, *Trends Food Sci. Technol.* 23 (2012) 83–96.
- [17] B. Yang, G. Yu, X. Zhao, G. Jiao, S. Ren, W. Chai, Mechanism of mild acid hydrolysis of galactan polysaccharides with highly ordered disaccharide repeats leading to a complete series of exclusively odd-numbered oligosaccharides. *FEBS J.* 276 (2009) 2125–2137.
- [18] V.L. Campo, D.F. Kawano, D.B. Silva Júnior, I. Carvalho, Carrageenans: biological properties, chemical modifications and structural analysis – A review, *Carbohydr. Polym.* 77 (2009) 167–180.
- [19] S. Bondu, E. Deslandes, M.S. Fabre, C. Berthou, Y. Guangli, Carrageenan from *Solieria chordalis* (Gigartinales): Structural analysis and immunological activities of the low molecular weight fractions. *Carbohydr. Polym.* 81 (2010) 448-460.
- [20] C.W. Greer, L. Shomer, M.E. Goldstein, W. Yaphe, Analysis of carrageenan from *Hypnea musciformis* by using k and ι-carrageenan and ¹³C NMR spectroscopy, *Carbohydr. Res.* 129 (1984) 189–196.
- [21] E.C. Oliveira, The seaweeds resources of Brazil, in: A.T. Critchley, M. Ohno (Eds), *Seaweeds resources of the world*, J. I. C. A., Japan, 1998, pp. 366-371.

- [22] V.A. Cosenza, D.A. Navarro, E.N. Fissore, A.M. Rojas, C.A. Stortz, Chemical and rheological characterization of the carrageenans from *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux, *Carbohydr. Polym.* 102 (2014) 780-789.
- [23] M. Arman, S.A.U. Qader, Structural analysis of kappa-carrageenan isolated from *Hypnea musciformis* (red algae) and evaluation as an elicitor of plant defense mechanism, *Carbohydr. Polym.* 88 (2012) 1264-127.
- [24] M. Aziza, T. Givernaud, M. Chikhaoui-Khay, L. Bennasser, Seasonal variation of the growth, chemical composition and carrageenan extracted from *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux harvested along the Atlantic coast of Morocco, *Sci. Res. Essay* 2 (2008) 509-514.
- [25] F.V. Velde, S.H. Knutsen, A.I. Usov, H.S. Rollema, A.S. Cerezo, ¹H and ¹³C high resolution NMR spectroscopy of carrageenans: application in research and industry, *Trends Food Sci. Technol.* 13 (2002) 73–92.
- [26] T.V. Brito, R.S. Prudêncio, A.B. Sales, F.C. Vieira Júnior, S.J.N. Candeira, A.X. Franco, K.S. Aragão, R.A. Ribeiro, M.H.L.P. Souza, L.S. Chaves, A.L.P. Freitas, J.V.R. Medeiros, A.L.R. Barbosa, Anti-inflammatory effect of a sulphated polysaccharide fraction extracted from the red algae *Hypnea musciformis* via the suppression of neutrophil migration by the nitric oxide signalling pathway, *J. Pharm. Pharmacol.* 65 (2013) 724-733.
- [27] S.R.B. Damasceno, J.C. Rodrigues, R.O. Silva, L.A.D. Nicolau, L.S. Chaves, A.L.P. Freitas, M.H.L.P. Souza, A.L.R. Barbosa, J.V.R. Medeiros, Role of the NO/KATP pathway in the protective effect of a sulfated-polysaccharide fraction from the algae *Hypnea musciformis* against ethanol-induced gastric damage in mice, *Braz. J. Pharmacog.* 23 (2013) 320-328.
- [28] K. Rahman, S. Barua, F. Islam, R. Islam, M.A. Sayeed, S. Parvin, E. Islam, Studies on the anti-diarrheal properties of leaf extract of *Desmodium puchellum*, *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 3 (2013) 639-643.
- [29] E.O. Awe, S.O. Kolawole, K.O. Wakeel, O.O. Abiodun, Antidiarrheal activity of *Pyrenacantha staudtii* Engl. (Iccacinaceae) aqueous leaf extract in rodents, *J Ethnopharmacol.* 137 (2011) 148– 153.
- [30] Q. Xu, Z. Shen, Y. Wang, S. Guo, F. Li, Y. Wang, C. Zhou, Anti-diarrhoeal and anti-microbial activity of Flos populi (male inflorescence of *Populus tomentosa* Carrière) aqueous extracts, *J. Ethnopharmacol.* 148 (2013) 640–646.

- [31] G. Gorkiewicz, G.G. Thallinger, S. Trajanoski, S. Lackner, G. Stocker, T. Hinterleitner, C. Gully, C. Hogenauer, Alterations in the colonic microbiota in response to osmotic diarrhea. *PLoS One* 8 (2013) e55817.
- [32] J.S. Choi, J.W. Kim, H.R. Cho, K.Y. Kim, J.K. Lee, J.A. Sohn, S.K. Ku, Laxative effects of fermented rice extract in rats with loperamide-induced constipation. *Exp. Ther. Med.* 8 (2014) 1847-1854.
- [33] 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 alga *Botryocladia occidentalis* and comparison of its anticoagulant action with that of sulfated galactans from invertebrates, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 29299-29307.
- [34] A.A. Albalasmeh, A.A. Berhe, T.A. Ghezzehei, A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry, *Carbohydr. Polym.* 97 (2013) 253-261.
- [35] 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.
- [36] F.J. Krug, Métodos de Preparo de Amostras: fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar, 1^a ed., CENA/USP, Piracicaba, 2010.
- [37] 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.
- [38] G.D. Dicarolo, N. Mascolo, A.A. Izzo, F. Capasso, G. Autore, Effects of quercetin on gastrointestinal tract in rats and mice, *Phytother. Res.* 8 (1994) 42–44.
- [39] A. Robert, J.E. Nezamis, C. Lancaster, A.J. Hanchar, M.S. Klepper, Enteropooling Assay: a test for diarrhea produced by prostaglandins, *Prostaglandins* 11 (1976) 809-828.
- [40] 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.
- [41] T.C. Morais, S.C. Lopes, K.M.M.B. 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.

- [42] P.K. Mukherjee, K. Saha, T. Murugesan, S.C. Mandal, M. Pal, B.P. Saha, Screening of anti-diarrhoeal profile of some plant extracts of a specific region of West Bengal, India J. Ethnopharmacol. 1 (1998) 85-89.
- [43] L. Tradtrantip, E.A. Ko, A.S. Verkman, Antidiarrheal efficacy and cellular mechanisms of a Thai Herbal remedy, PLoS Negl. Trop. Dis. 8 (2014) 1-11.
- [44] 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.
- [45] M.R.S. Melo, J.P.A. Feitosa, A.L.P. Freitas, R.C.M. Paula, Isolation and characterization of soluble sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria cornea*, Carbohydr. Polym. 49 (2002) 491-498.
- [46] J. Liu, X. Zhan, J. Wan, Y. Wang, C. Wang, Review for carrageenan-based pharmaceutical biomaterials: Favourable physical features versus adverse biological effects, Carbohydr. Polym. 121 (2015) 27-36.
- [47] E. Vázquez-Delfín, D. Robledo, Y. Freile-Pelegrín, Microwave-assisted extraction of the carrageenan from *Hypnea musciformis* (Cystocloniaceae, Rhodophyta), J. Appl. Phycol. 26 (2014) 901-907.
- [48] L.A. Gurgel, D.T.O. Martins, P.O. Mattos, V.S. Rao, Estudo da atividade antidiarréica e antissecretória intestinal do látex do *Croton urucurana* Baill, Rev. Bras. Farmacogn. 12 (2002) 39 – 42.
- [49] L.C. Racusen, H.J. Binder, Ricinoleic acid stimulation of active anion secretion in colonic mucosa of the rat, J. Clin. Invest. 63 (1979) 743-749.
- [50] T.S. Gaginella, M.D Phillips, Ricinoleic acid: current view of an ancient oil, Am. J. Dig. Dis. 20 (1975) 1171–1177.
- [51] T.S. Gaginella, V.S. Chadwick, J.C. Debongnie, J.C. Lewis, S.F. Phillips, Perfusion of rabbit colon with ricinoleic acid: dose-related mucosal injury, fluid secretion and increased permeability, Gastroenterology 73 (1977) 95-101.
- [52] F. Capasso, N. Mascolo, G. Autore, V. Romano. Laxatives and the production of autacoids by rat colon, J. Pharm. Pharmacol. 38 (1986) 627-629.
- [53] A. Pinto, A. Calignano, N. Mascolo, G. Autore, F. Capasso. Castor oil increases intestinal formation of platelet activating factor and acid phosphatase release in the rat. Br. J. Pharmacol. 96 (1989) 872-874.
- [54] W.K. MacNaughton, Nitric oxide-donating compounds stimulate electrolyte transport in the guinea pig intestine in vitro, Life Sci. 53 (1993) 585-593.

- [55] N. Mascolo, A.A. Izzo, G. Autore, F. Barbato, F. Capasso, Nitric oxide and castor oil-induced diarrhea, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 268 (1993) 291-295.
- [56] J.R. Grider, K.S. Murthy, J.G. Jin, G.M. Makhlof, Stimulation of nitric oxide from muscle cells by VIP: Prejunctional enhancement of VIP release, *Am. J. Physiol.* 262 (1992) 774-778.
- [57] T. Croci, M. Landi, X. Emonds-Alt, G. Le Fur, J.P. Maffrand, L. Manara, Role of tachykinins in castor oil diarrhea in rats, *Br. J. Pharmacol.* 121 (1997) 375-380.
- [58] K. Rahman, S. Barua, F. Islam, R. Islam, M.A. Sayeed, S. Parvin, E. Islam, Studies on the anti-diarrheal properties of leaf extract of *Desmodium puchellum*. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 3 (2013) 639–643.
- [59] S.K. Prasad, D. Jain, D.K. Patel, A.N. Sahu, S. Hemalatha, Antisecretory and antimotility activity of *Aconitum heterophyllum* and its significance in treatment of diarrhea, *Indian J. Pharmacol.* 46 (2014) 82-87.
- [60] Y. Takada, K. Matsuo, H. Ogura, L. Bai, A. Toki, L. Wang, M. Ando, T. Kataoka, Odoroside A and ouabain inhibit Na^+/K^+ -ATPase and prevent NF- κ B-inducible protein expression by blocking Na^+ -dependent amino acid transport, *Biochem. Pharmacol.* 78 (2009) 1157–1166.
- [61] S.I. Kreydiyyeh, Cyclic AMP and furosemide stimulate the $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase in isolated rat jejunal cells, *Pharmacol. Res.* 41 (2000) 179-185.
- [62] M.T. Yakubu, Q.O. Nurudeen, S.S. Salimon, M.O. Yakubu, R.O. Jimoh, M.O. Nafiu, M.A. Akanji, A.T. Oladiji, F.E. Williams, Antidiarrhoeal activity of *Musa paradisiaca* Sap in wistar rats, *Evid. Based Complement. Altern. Med.* (2015).
- [63] D. Rachmilewitz, F. Karmeli, P. Sharon, Decreased colonic $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase activity in active ulcerative colitis, *Isr. J. Med. Sci.* 20 (1984) 681-684.
- [64] M.T. Yakubu, S.S. Salimon, Antidiarrhoeal activity of aqueous extract of *Mangifera indica* L. leaves in female albino rats, *J. Ethnopharmacol.* 163 (2015) 135–141.
- [65] A.A. Izzo, N. Mascolo, F. Borrelli, F. Capasso, Defaecation, intestinal fluid accumulation and motility in rodents: implications of cannabinoid CB1 receptors, *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 359 (1999) 65-70.
- [66] A.D. Suchitra, S.A. Dkhar, D.G. Shewade, C.H. Shashindran, Relative efficacy of some prokinetic drugs in morphine-induced gastrointestinal transit delay in mice, *World J. Gastroenterol.* 9 (2003) 779-83.

- [67] O.O. Adeyemi, A.J. Akindele, Antidiarrhoeal activity of the ethyl acetate extract of *Baphia nitida* (Papilionaceae), *J. Ethnopharmacol.* 116 (2008) 407–412.
- [68] S. Ince, R. Turkmen, H. Yavuz, The effect of boric acid on acetylcholine, bethanechol and potassium-evoked responses on ileum of rat, *Auton. Autacoid Pharmacol.* 31 (2011) 50–56.
- [69] T.J. Williams, J. Morley, Prostaglandins as potentiators of increased vascular permeability in inflammation, *Nature* 246 (1973) 215–217.
- [70] A. Botella, M. Delvaux, J. Fioramonti, J. Frexinos, L. Bueno, Receptor subtypes involved in dual effects induced by prostaglandin E₂ in circular smooth muscle from dog colon, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 273 (1995) 1008–14.
- [71] D.A. Ahlquist, J.A. Duenes, T.H. Madson, J.C. Romero, R.R. Dozois, J.R. Malagelada, Prostaglandin generation from gastroduodenal mucosa: regional and species differences, *Prostaglandins* 24 (1982) 115–25.
- [72] L. Grasa, M.P. Arruebo, M.A. Plaza, M.D. Murillo, PGE₂ receptors and their intracellular mechanisms in rabbit small intestine, *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 79 (2006) 206–217.
- [73] Z. Li, H. Vaziri, Treatment of chronic diarrhea, *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 26 (2012) 677–687.
- [74] V. Tangpu, A.K. Yadav, Antidiarrhoeal activity of *Rhus javanica* ripen fruit extract in albino mice, *Fitoterapia.* 75 (2004) 39–44.
- [75] H.E. Luca, W.I. Lencer, A biochemical method for tracking cholera toxin transport from plasma membrane to golgi and endoplasmic reticulum, *Methods Mol. Biol.* 341 (2006) 127-139.
- [76] W.I. Lencer, Retrograde transporte of cholera toxin into the ER of host cells, *Int. J. Med. Microbiol.* 293 (2004) 491 – 494.
- [77] J. Sanchez, J. Holmgren, Virulence factors, pathogenesis and vaccine protection in cholera and ETEC diarrhea, *Curr. Opin. Immunol.* 17 (2005) 388–398.
- [78] B.D. Spangler, Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin, *Microbiol. Rev.* 56 (1992) 622–647.
- [79] F.P. Rivera, A.M. Medina, S. Bezada, R. Valencia, M. Bernal, R. Meza, R.C. Maves, T.J. Ochoa, Bovine lactoferrin decreases cholera-toxin-induced intestinal fluid accumulation in mice by ganglioside interaction, *PLoS ONE.* 8 (2013) e59253.

- [80] H.R. Sinclair, C.W. Smejkal, C. Glister, F. Kemp, E.V.D. Heuvel, J. Slegte, G.R. Gibson, R.A. Rastall, Sialyloligosaccharides inhibit cholera toxin binding to the GM1 receptor, *Carbohydr. Res.* 343 (2008) 2589–2594.
- [81] T.S.L. Araújo, D.S. Costa, N.A. Sousa, L.K.M. Souza, S. Araújo, A.P. Oliveira, F.B.M. Sousa, D.A. Silva, A.L.R. Barbosa, J.R.S.A. Leite, J.V.R. Medeiros, Antidiarrheal activity of cashew gum, a complex heteropolysaccharide extracted from exudate of *Anacardium occidentale* L. in rodents, *J. Ethnopharmacol.* 174 (2015) 299–307.

Figure Legends

Fig. 1. Effects of pretreatment with PLS on the severity of castor oil-induced diarrhea in rats. Three hours after administration of castor oil, all the rats in the control group produced copious amounts of diarrhea. PLS at all doses (10, 30, and 90 mg/kg, *p.o.*) significantly reduced the severity of diarrheal defecation, as measured by the general diarrhea numerical score, as compared with the control treatment. The standard anti-diarrheal drug, loperamide (5 mg/kg, *p.o.*) decreased the fluidity of feces significantly. Data are presented as the median and minimum/maximum range. #*P* < 0.05 vs. saline group; **P* < 0.05 vs. control group. Non-parametric Kruskal–Wallis test followed by the Dunn test was used for multiple comparisons. Abbreviations: Lop: loperamide; PLS: sulfated polysaccharide fraction obtained from the red seaweed *H. musciformis*; Sal: saline.

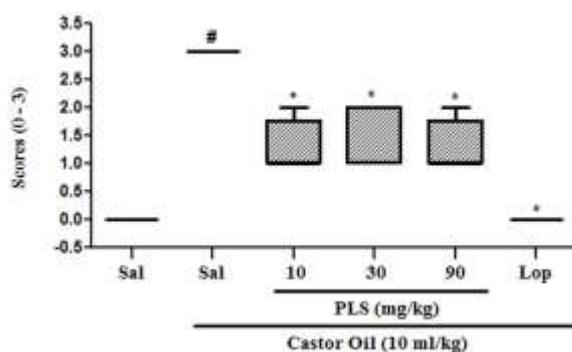


Fig. 2. Effect of the PLS on activity of the enzyme Na^+/K^+ -ATPase in the small intestine of mice with castor oil-induced diarrhea. The Na^+/K^+ -ATPase activity in the supernatant of the intestine was measured by determining the release of inorganic phosphate from the hydrolysis of ATP. Pretreatment with PLS (90 mg/kg, *p. o.*) increased the activity of Na^+/K^+ -ATPase significantly ($P < 0.05$) as compared to the castor oil group. Loperamide (5 mg/kg, *p.o.*) produced a similar but smaller effect than PLS. The results are represented as mean \pm SEM. # $P < 0.05$ vs. saline group; * $P < 0.05$ vs. saline + castor oil. ANOVA and Newman–Keuls test. Abbreviations: Lop, loperamide; PLS, sulfated polysaccharide fraction from the red seaweed *H. musciformis*; Sal, saline.

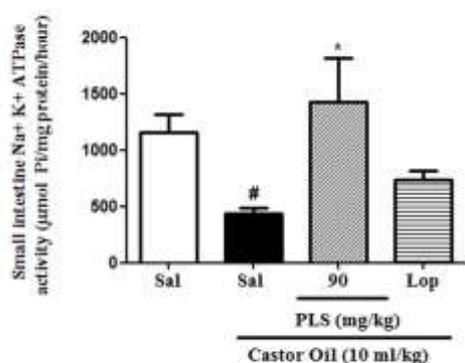


Fig. 3. Naloxone did not reverse the effect of PLS on castor oil-induced gastrointestinal transit in mice. The animals received castor oil to produce diarrhea. PLS treatment (90 mg/kg, *p.o.*) significantly ($P < 0.01$) decreased the transit of a charcoal meal (marker) through the small intestine. Loperamide (5 mg/kg, *p.o.*) had an effect comparable to that of PLS. Pretreatment of the PLS-treated test group with naloxone (2 mg/kg, *s.c.*) did not reverse the anti-motility effect of PLS. The results are expressed as mean \pm SEM of a minimum of 6 animals per group. * $P < 0.01$ vs. saline group; # $P < 0.01$ vs. saline + naloxone group; $\delta P < 0.01$, loperamide treatment with vs. without naloxone. ANOVA and Newman–Keuls test. Abbreviations: Lop: loperamide; PLS: sulfated-polysaccharide fraction from the red seaweed *H. musciformis*; Sal: saline.

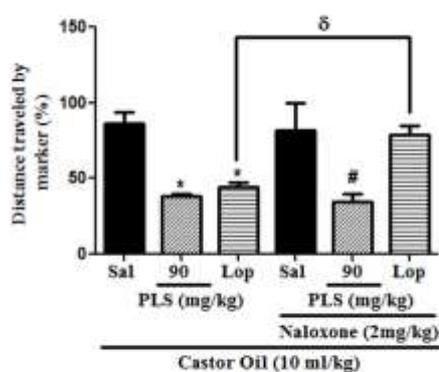


Fig. 4. PLS reversed the stimulatory effect of bethanechol on gastrointestinal transit in mice. Bethanechol (3 mg/kg, *i.p.*), a cholinergic agonist, significantly increased the percentage of distance traveled by a charcoal meal through the intestine ($P < 0.01$) compared to treatment with saline only. PLS pretreatment (90 mg/kg, *p.o.*) significantly ($P < 0.01$) decreased the propulsive movement and transit of a charcoal meal (marker) through the small intestine. Atropine (3 mg/kg, *s.c.*) had an effect comparable to PLS. The results are expressed as mean \pm SEM of a minimum of 6 animals per group. * $P < 0.001$ vs. saline + bethanechol group; # $P < 0.01$ vs. saline only. ANOVA and Newman–Keuls test. Abbreviations: Atr: atropine; PLS: sulfated-polysaccharide fraction from the red seaweed *H. musciformis*; Sal: saline.

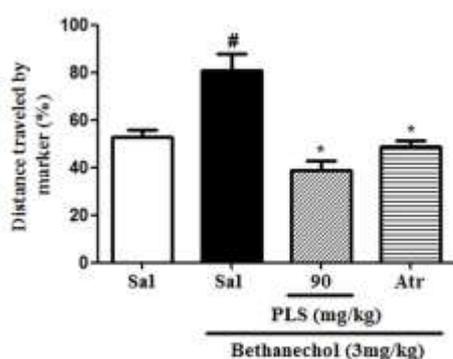


Fig. 5. PLS inhibits cholera toxin (CT)-induced fluid secretion in the intestinal closed loops model. (A) Pretreatment with PLS (90 mg/Kg. *p.o.*) significantly reduced ($P < 0.001$) intestinal fluid secretion accumulation measured at 4 h after inoculation of CT (1 $\mu\text{g}/\text{loop}$) into an intestinal loop. (B) Fluid secretion was measured indirectly as loop weight/length ratio (g/cm). (C). The Cl^- levels were significantly reduced ($P < 0.001$) in the intestinal contents of the animals pretreated with PLS. (D) PLS had no effect on intestinal fluid absorption, shown indirectly as the loop weight/length ratio at 30 min after injection of PLS into the intestinal loop. Data are expressed as mean \pm SEM of a minimum of 6 rats per group. $\#P < 0.001$ vs. PBS group; $*P < 0.001$ vs. CT group; $\delta P < 0.001$ vs. glucose group. ANOVA and Newman-Keuls test. Abbreviations: PBS, phosphate-buffered saline; PLS, sulfated polysaccharide fraction from red seaweed *H. musciformis*; Sal, saline.

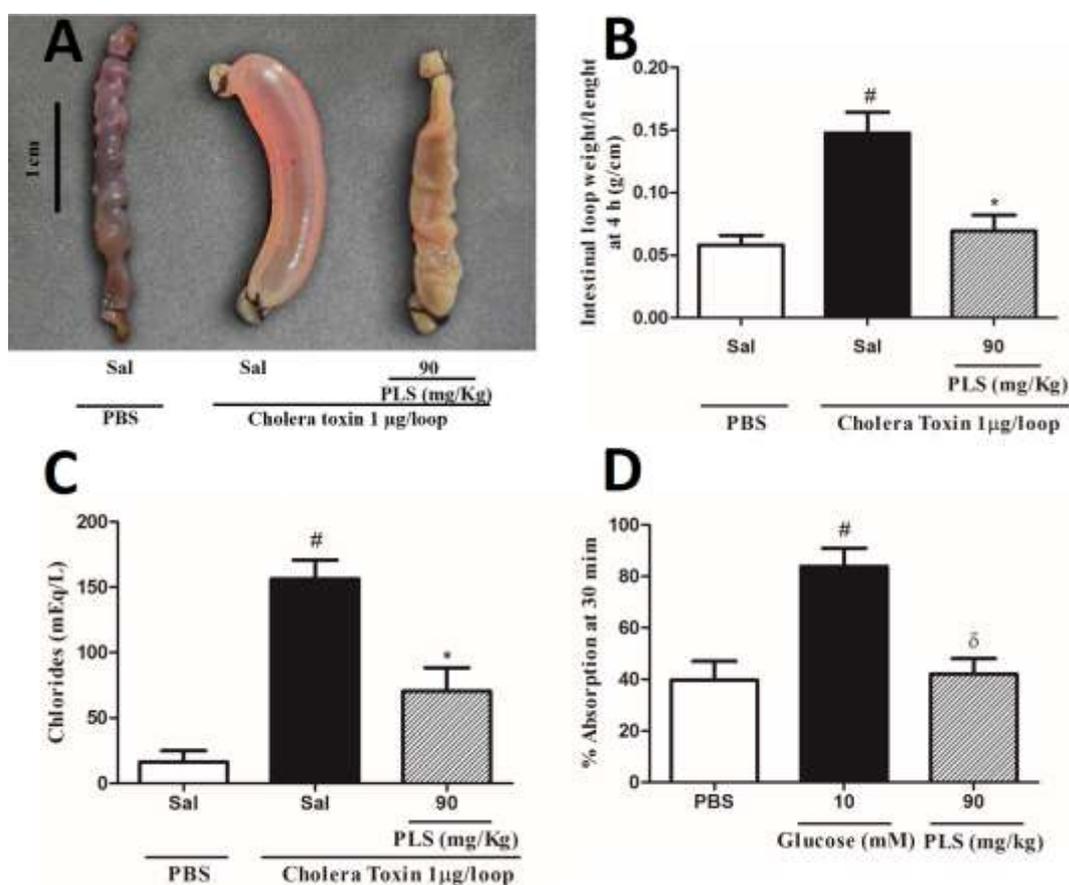


Fig. 6. Effects of PLS on cholera toxin (CT)–GM1 receptor binding. CT (100 ng) was incubated alone (column a) or with 1, 10, 50, 100, 300, or 500 mg/ml of PLS (columns c to h, respectively), and the amount of PLS was estimated by GM1 ELISA. GM1-coated wells were pre-incubated with PLS and then washed, after which 100 ng CT was added to the wells before the amount of bound CT was estimated by ELISA (column b). Values obtained for 100 ng of PLS were taken as 100% binding. Data shown are the mean \pm SEM from 3 independent triplicate experiments performed under similar conditions. * $P < 0.001$ vs. column a.

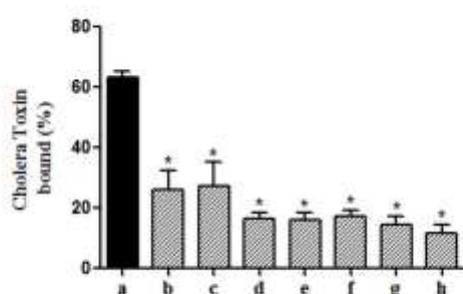


Table 1Effects of PLS (10, 30, 90 mg/kg *p.o.*) on castor oil-induced diarrhea in rats.

Treatment	Dose	Total number of stools (g)	Inhibition of defecation (%)	Total number of diarrheal stools (g)	Inhibition of diarrhea (%)
Castor oil	2.5 (ml/Kg)	41.730 ± 0.005	-	38.600 ± 0.005	-
PLS	10 (mg/Kg)	22.250 ± 0.008*	46.681	18.980 ± 0.008*	50.829
PLS	30 (mg/Kg)	26.930 ± 0.007*	35.466	20.520 ± 0.007*	46.839
PLS	90 (mg/Kg)	17.100 ± 0.008*	59.022	14.220 ± 0.008*	63.160
Loperamide	5 (mg/Kg)	0.240 ± 0.011*	99.424	0.240 ± 0.011*	99.378

Values are presented as mean ± SEM. Number of animals/group = 5-6. *P < 0.05 vs. control group.

Table 2

Effects of PLS (10, 30, 90 mg/kg *p.o.*) on castor oil-induced intestinal fluid accumulation (enteropooling) in rats.

Treatment	Dose	Intestinal fluid (ml)	Inhibition of Intestinal fluid volume (%)
Castor oil	2.5 (ml/kg)	2.175 ± 0.184	-
PLS	10 (mg/kg)	1.650 ± 0.184	24.137
PLS	30 (mg/kg)	1.725 ± 0.085	20.689
PLS	90 (mg/kg)	1.233 ± 0.145*	43.310
Loperamide	5 (mg/kg)	1.200 ± 0.115*	44.827

Values are presented as mean ± SEM. Number of animals/group = 5-6.

*P < 0.05 vs. control group.

Table 3

Effects of PLS (90 mg/kg *p.o.*) on PGE₂-induced intestinal fluid accumulation (enteropooling) in rats.

Treatment	Dose	Intestinal fluid (ml)	Inhibition of Intestinal fluid volume (%)
Saline	2.5 (ml/kg)	0.420 ± 0.165	-
Control (PGE ₂ in saline)	100 (µg/kg)	1.825 ± 0.193 [#]	-
PLS	90 (mg/kg)	0.900 ± 0.230*	50.684
Loperamide	5 (mg/kg)	0.960 ± 0.040**	47.397

Values are presented as mean ± SEM. Number of animals/group = 5-6.

[#]P < 0.001 vs. saline; *P < 0.05 vs. PGE₂ in saline. ** P < 0.01 vs. PGE₂ in saline.