



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**NUCLEO DE PESQUISAS DE PLANTAS MEDICINAIS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**AVALIAÇÃO DE EFEITO HIPOCINETICO DO MENTOFURANO NO TRATO  
GASTROINTESTINAL DE ROEDORES**

**RAILSON DE SOUSA SANTOS**

**TERESINA**  
**2016**

**RAILSON DE SOUSA SANTOS**

**AVALIAÇÃO DE EFEITO HIPOCINETICO DO MENTOFURANO NO TRATO  
GASTROINTESTINAL DE ROEDORES**

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

Orientadora: Profa. Dra. Maria do Carmo de Carvalho e Martins

Co-orientadora: Profa. Dra. Rita de Cássia Meneses Oliveira

**TERESINA  
2016**

**RAILSON DE SOUSA SANTOS**

**AVALIAÇÃO DE EFEITO HIPOCINETICO DO MENTOFURANO NO TRATO  
GASTROINTESTINAL DE ROEDORES**

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

Data da aprovação: \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2016

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Profa. Dra. Maria do Carmo de Carvalho e Martins**  
**(Orientadora)**  
**Universidade Federal do Piauí**

---

**Prof. Dr. Paulo Humberto Moreira Nunes**  
**(Membro)**

---

**Prof. Dr. Francisco de Assis Oliveira**  
**(Membro)**

# **Dedicatória**

*Aos meus pais pela compreensão e  
amor incondicional.*

**Epigrafe**

*“O segredo da existência não consiste  
somente em viver, mas em saber para  
que se vive.”*

FIÓDOR MIKHAILOVICH DOSTOIÉVSKI

**Resumo**



**SANTOS, R. S.** Avaliação de efeito hipocinético do mentofurano no trato gastrointestinal de roedores (2016). Dissertação de Mestrado em Farmacologia – PPGF/NPPM/CCS/UFPI. 62 p.

## RESUMO

O mentofurano ( $C_{10}H_{14}O$ ) é um monoterpene encontrado no óleo essencial de espécies do gênero *Mentha*. Os monoterpenos constituem-se em grupo de compostos químicos com diferentes atividades biológicas, e para alguns foi demonstrada atividade no sistema digestório. Este trabalho investigou o efeito hipocinético do mentofurano no trato gastrointestinal de roedores. Esse efeito foi avaliado por meio dos seguintes modelos experimentais: esvaziamento gástrico (n=7 animais/grupo), trânsito intestinal (n=8 animais/grupo) e atividade antidiarreica (n=8 animais/grupo) em camundongos; atividade espasmolítica em íleo isolado de ratos (n=6). Também foi realizado estudo de toxicidade aguda *in vivo* em camundongos (n=6 animais/grupo), em que a administração de dose de 2.000 mg/kg (v.o) não produziu mortes nem alterações indicativas de toxicidade aguda sistêmica. No modelo de esvaziamento gástrico com vermelho de fenol, o mentofurano (MFur) nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg (v.o) reduziu significativamente ( $p < 0,01$ ) o esvaziamento gástrico em relação ao grupo controle. Na avaliação do efeito deste monoterpene no trânsito intestinal, observou-se que MFur, nas doses de 50 e 100 mg/kg (v.o), mas não na de 25 mg/kg, diminuiu ( $p < 0,05$ ) o trânsito intestinal quando comparado ao grupo controle. Ademais, apresentou efeito hipocinético semelhante ao do fármaco escopolamina. No modelo de hipermotilidade intestinal provocada por óleo de rícino, o MFur 50 e 100 mg/kg (v.o) reduziu ( $p < 0,05$ ) a quantidade de fezes moles eliminadas na terceira hora quando comparado ao grupo veículo, sem diferença estatística em relação ao grupo normal. Na avaliação de efeito espasmolítico, MFur nas concentrações de  $10^{-8}$  a  $10^{-3}$   $\mu\text{g/mL}$  (n = 4) produziu relaxamento, dependente de concentração, em segmentos de íleo de rato pré-contráídos com KCl ( $CE_{50} = 0,059 \pm 0,008$   $\mu\text{g/mL}$ ) e carbacol ( $CE_{50} = 0,068 \pm 0,007$   $\mu\text{g/mL}$ ), com potências semelhantes para relaxamento do íleo nos dois modelos. O mentofurano apresenta baixo efeito tóxico agudo *in vivo* e diminui a motilidade gastrointestinal, efeito evidenciado pelo retardo no esvaziamento gástrico, pela redução do trânsito intestinal normal e pelo efeito espasmolítico em íleo isolado de rato. Esse último efeito sugere envolvimento de ativação de canais de potássio e/ou de redução do influxo de cálcio, o que requer estudos adicionais.

**Palavras-chave:** Mentofurano; Monoterpene; Esvaziamento gástrico; Trânsito intestinal; Espasmolítico.

# **Abstract**

**SANTOS, R. S.** Hypokinetic effect evaluation on gastrointestinal motility menthofuran rodent. Graduate Pharmacology (2016). Masters dissertation, NPPM/CCS/UFPI. 62 p.

## ABSTRACT

The menthofuran (C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>O) is a monoterpene found in the essential oil of *Mentha* genus. The monoterpenes are in a group of chemical compounds with different biological activities, and some has been demonstrated activity in the digestive system. This paper investigates the effect of hypokinetic menthofuran in the gastrointestinal tract of rodents. This effect was evaluated using the following experimental models: gastric emptying (n = 7 animals / group), intestinal transit (n = 8 animals / group) and antidiarrheal activity (n = 8 animals / group) in mice; spasmolytic activity on isolated ileum of rats (n = 6). It was also conducted acute toxicity study in vivo in mice (n = 6 animals / group), in which the dose administration of 2.000 mg / kg (v.o) produced no deaths or changes indicative of systemic acute toxicity. In the model of gastric emptying with phenol red, the menthofuran (MFur) at doses of 25, 50 and 100 mg / kg (v.o) decreased significantly (p <0.01) gastric emptying in the control group. In evaluating the effect of monoterpene in the intestinal transit, it was observed that MFur at doses of 50 and 100 mg / kg (po), but not at 25 mg / kg, decreased (p <0.05) when intestinal transit compared to the control group. Moreover, it presented hypokinetic effect similar to that of the drug scopolamine. In the model of intestinal hypermotility induced castor oil, MFur 50 and 100 mg / kg (po) reduced (p <0.05) the number of loose stools disposed in the third hour when compared to the vehicle group, no statistical difference the normal group. In evaluating spasmolytic effect, MFur at concentrations of 10<sup>-8</sup> to 10<sup>-3</sup> g / ml (n = 4) produced relaxation dependent on concentration in rat ileum segments contracted with KCl (EC<sub>50</sub> = 0.059 ± 0.008 ug / ml) and carbachol (EC<sub>50</sub> = 0.068 ± 0.007 mg / mL) with similar potencies for relaxation of the ileum in both models. The menthofuran has low acute toxic effect in vivo and decreases gastrointestinal motility, effect evidenced by delayed gastric emptying, by reducing the normal intestinal transit and the spasmolytic effect in ileum mouse. This latter effect suggests involvement activation of potassium channels and / or reduction of calcium influx, which requires further study.

**Keywords:** Menthofuran; Monoterpene; Gastric emptying; Intestinal transit; Spasmolytic

# **Lista de ilustrações**

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>FIGURA 1</b> – Estrutura química do Mentofurano.....	32
<b>FIGURA 2</b> – Efeito do tratamento com mentofurano por via oral nas doses de 25 mg/kg (MFur-25), 50 mg/kg (MFur-50) e 100 mg/kg (MFur-100) e da escopolamina 10 mg/kg (Escop-10) sobre o esvaziamento gástrico pelo método vermelho de fenol em camundongos.....	41
<b>FIGURA 3</b> – Efeito do tratamento com mentofurano por via oral nas doses de 25 mg/kg (MFur-25), 50 mg/kg (MFur-50) e 100 mg/kg (MFur-100) e da escopolamina 12 mg/kg (Escop-12) sobre o trânsito intestinal normal em camundongos.....	42
<b>FIGURA 4</b> – Efeito do mentofurano – Mfur (25, 50, e 100 mg/kg) e da loperamida (6 mg/kg) sobre a eliminação de fezes moles 30, 60, 90 min e 2, 3 e 4 h após indução de hipermotilidade intestinal por óleo de rícino em camundongos.....	43
<b>FIGURA 5</b> – Efeito mentofurano em concentrações variando de $10^{-8}$ a $10^{-3}$ 50 $\mu\text{g/mL}$ sobre a contração induzida por cabacol (CCh) $10^{-6}$ e KCl 40mM em segmentos isolados de íleo de rato.....	44
<b>TABELA 1</b> – Efeito do mentofurano (25, 50, e 100 mg/kg) e da loperamida (6 mg/kg) sobre a hipermotilidade intestinal induzida por óleo de rícino em camundongos .....	44

# **Lista de abreviaturas**

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AGE</b>	Produto final da glicação avançada
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>CEEA</b>	Comitê de Ética em Experimentação Animal
<b>COBEA</b>	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
<b>CONCEA</b>	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
<b>CRMV</b>	Conselho Regional de Medicina Veterinária
<b>EG</b>	Esvaziamento gástrico
<b>E. P. M.</b>	Erro padrão da média
<b>FBG</b>	Federação Brasileira de Gastroenterologia
<b>i.p.</b>	Intraperitoneal
<b>MFur</b>	Mentofurano
<b>NPPM</b>	Núcleo de Pesquisas em Plantas Mediciniais
<b>PGs</b>	Prostaglandinas
<b>OECD</b>	Organization for Economic Cooperation and Development
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>SNE</b>	Sistema Nervoso Entérico
<b>TGI</b>	Trato gastrintestinal
<b>v.o.</b>	Via oral

# **Agradecimentos**



## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer primeiramente a DEUS, por ter me concedido a graça de concluir esse curso apesar de tantas tribulações e momentos de agonia, mas tudo ocorreu segundo a sua sabedoria, e eu respeito e o louvo por isso e para sempre o louvarei.

A minha mãe, Raimunda Nonata de Sousa Santos, ao meu pai Raimundo Nonato Soares dos Santos pelo apoio, força e amor incondicional em todos os momentos da minha vida, aos meus irmãos Rairon de Sousa Santos e Ramaria de Sousa Santos, a quem serei eternamente grato.

À Universidade Federal do Piauí por fazer parte da minha vida, onde estudei por 10 anos incluindo ensino médio, curso profissionalizante, graduação e agora pós-graduação a nível de mestrado, aprendi muito, fiz muitas amizades e continuarei a aprender através dessa instituição, obrigado UFPI.

Ao Núcleo de Pesquisas em Plantas Mediciniais (NPPM), por ter recebido um graduado em Medicina Veterinária e devolvido a sociedade um farmacologista, que buscará sempre aprender mais e mais.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, sob a coordenação da professora Dra. Fernanda Regina de Castro Almeida e professora Dra. Rita de Cássia Meneses pelo compromisso e seriedade na qual conduzem o programa, estimulando sempre os alunos a buscarem o conhecimento científico.

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Farmacologia: Aldeídia Pereira, Fernanda Regina Almeida, Rita de Cássia Meneses, Rosimeire Ferreira, Salete Brito, Fernando Aécio Amorim, Francisco Oliveira, Jand Venes Medeiros, Leonardo Torres, Maria do Carmo de Carvalho e Martins, Moisés Tolentino e Rozeverter Moreno por ter nos transmitido seus conhecimentos científicos de forma tranquila e eficaz sempre com muito amor ao ensino.

A minha querida e admirável orientadora, professora Dra. Maria do Carmo de Carvalho e Martins, que acolheu-me em um momento difícil e como uma mãe foi paciente, amorosa, transmitiu através de atitudes e poucas palavras o maior mandamento que o ser humano pode guardar "amarás o teu próximo como a si mesmo". Muito obrigado professora Carminha.

Ao professor Doutor Paulo Humberto Moreira Nunes, por ser um humano bondoso, humilde e amigo, além de um professor que não mede esforços para conduzir os seus alunos pelo melhor caminho, o da humildade, sabedoria e amor ao próximo. Muito obrigado professor Paulo, Deus sempre o proteja.

A todos os alunos que contribuíram nos experimentos, os amigos da graduação de medicina os alunos da pós-graduação em Farmacologia, muito obrigado em especial ao Rafael, Karol, Geovanni, Vanessa e Naira, obrigado por tudo.

Aos meus colegas de turma de mestrado no Programa de Pós-graduação em Farmacologia: Adriana Cunha, Benedito Neto, Deyna Próspero, Fabiana Moura,

Naira Alves, Lucas Brito e Lucas Rodrigues, por compartilharem momentos de aprendizagem e pelos inúmeros momentos que passamos juntos, às vezes alegres outras vezes na agonia e desespero pela pressão dos seminários, mas graças a Deus estamos bem.

Aos amigos que fiz no NPPM: Everton Lopes, Benedito Neto, José Couras, Bruno Gomes, Pedro Simão, Daniel Arcanjo, Maurício, Carlos Filho, Marcelo, Layane Amorim, Karol, Vanessa, Geovanni, Rafael Almendra, Óscar, Josynaria Araujo, Irisdalva Oliveria, Francilene, Ana Flavia, Flavia Francele, Celiane, Hélio, Márcio Edivandro, Ilmara Cecília, Emanuella Feitosa, pelos momentos de descontração em meio a tensão e ajuda nas horas de aperreio.

Aos funcionários do NPPM, Gleice Lima, Patrícia Portela, Josi, seu Carlos e Kalina por estarem sempre disponíveis para ajudar.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior), pelo apoio financeiro e suporte técnico científico.

Aos meus amigos Luiz Neto, Demétrio Filho, Eremilton Lopes, Italo Sena, Siluana Benvindo e Rogério Holanda que sempre estiveram aptos a dar uma palavra de encorajamento e força em meio as dificuldades, obrigado pessoal.

Aos meus queridos professores de graduação Luciana Machado e Alécio Mattos, por serem grandes professores e ao mesmo tempo grandes amigos, obrigado inesquecíveis mestres.

# **Sumário**

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	22
<b>1.1 Epidemiologia das diarreias</b> .....	23
<b>1.2 Classificação das diarreias</b> .....	25
1.2.1 Diarreias agudas.....	25
1.2.2 Diarreia do viajante.....	26
1.2.3 Diarreia osmótica.....	26
1.2.4 Diarreia crônica.....	27
<b>1.3 Tratamento medicamentoso da diarreia</b> .....	28
<b>1.4 Importância dos modelos de estudo de motilidade gastrointestinal</b> .....	29
<b>1.5 Produtos naturais e derivados no manejo da diarreia</b> .....	30
<b>1.6 Mentofurano</b> .....	31
<b>2. OBJETIVO</b> .....	34
<b>2.1 Geral</b> .....	34
<b>2.2 Específicos</b> .....	34
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	36
<b>3.1 Obtenção do mentofurano</b> .....	36
<b>3.2 Animais</b> .....	36
<b>3.3 Protocolos experimentais</b> .....	36
3.3.1 Avaliação de toxicidade aguda do mentofurano .....	36
3.3.2 Avaliação do efeito do mentofurano sobre o esvaziamento gástrico pelo método do corante vermelho de fenol.....	37
3.3.3 Avaliação do efeito do mentofurano no trânsito intestinal no modelo do carvão ativado em camundongos.....	38
3.3.4 Avaliação do efeito do mentofurano sobre a hipermotilidade intestinal (antidiarreica) induzida por óleo de rícino em camundongos.....	38
3.3.5 Avaliação da atividade espasmolítica do mentofurano em íleo isolado.....	39
<b>3.4 Análise Estatística</b> .....	39
<b>4. RESULTADOS</b> .....	41
<b>4.1 Avaliação de toxicidade aguda do mentofurano</b> .....	41
<b>4.2 Efeito do mentofurano sobre o esvaziamento gástrico</b> .....	41

<b>4.3 Efeito do mentofurano no trânsito intestinal.....</b>	<b>42</b>
<b>4.4 Efeito do mentofurano em modelo de hipermotilidade intestinal provocada por óleo de rícino.....</b>	<b>42</b>
<b>4.5 Avaliação da atividade espasmolítica do mentofurano em Íleo isolado.....</b>	<b>44</b>
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>46</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>52</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>54</b>

# **Introdução**

## 1 INTRODUÇÃO

As plantas, bem como os produtos naturais de forma geral, são consideradas como a principal fonte de compostos bioativos para o desenvolvimento de novos medicamentos (BANERJERE et al., 2014). No Brasil, a utilização desses produtos com finalidade terapêutica, é feita em larga escala, principalmente nas regiões norte e nordeste, em decorrência das condições socioeconômicas e culturais da população. Desse modo, há grande interesse em estudos para o desenvolvimento de novos fitofármacos e caracterização de substâncias naturais bioativas extraídas de plantas com atividade farmacológica como alternativas na terapêutica atual (CARNEIRO et al., 2014).

Considerando que a via oral é a mais utilizada para a administração de medicamentos, a medida da velocidade do trânsito intestinal e de efeitos de produtos naturais e compostos isolados na motilidade gastrointestinal é etapa obrigatória na investigação de atividade farmacológica para desenvolvimento de novos fitoterápicos, uma vez que a velocidade do trânsito gastrointestinal é um dos fatores que determina a intensidade de absorção do conteúdo luminal e regula a biodisponibilidade de fármacos administrados por via oral, além de servir para a pesquisa de compostos inibitórios ou estimulatórios da atividade peristáltica (LEITE et al, 2014).

Apesar do grande número de grupos de pesquisa no Brasil trabalhando em prol do desenvolvimento da química e farmacologia de produtos naturais, numerosas espécies vegetais e seus subprodutos naturais não foram ainda estudados (CALIXTO, 2003). Desse modo, estudos com produtos naturais são de grande relevância, tendo em vista a importância desses no tratamento de doenças dos diversos sistemas do organismo humano.

Os óleos essenciais extraídos de plantas têm atraído muita atenção como fitoterápicos potenciais (ZU et al., 2010). Deles podem ser isoladas novas moléculas potenciais em misturas de compostos bioativos, que podem ser exploradas industrialmente como bioprodutos úteis tanto para a indústria farmacêutica quanto alimentícia. Muitas delas apresentam potencial farmacológico que pode ser de benefício terapêutico no tratamento de doenças (DERWICH; BENZIANE; BOUKIR, 2010).

É importante salientar que as afecções que envolvem alterações da motilidade do trato gastrointestinal (TGI) apresentam-se como um problema de grande impacto na população mundial. De acordo com a Federação Brasileira de Gastroenterologia (FBG) a prevalência das doenças de trato gastrointestinal na população brasileira é elevada sendo os principais distúrbios a síndrome do intestino irritável e a constipação intestinal. Dor ou desconforto abdominal, funcionamento intestinal alterado com constipação e diarreia e inchaço são alguns dos sintomas encontrados com maior na população em geral (SPILLER; THOMPSON, 2012).

A diarreia aparece como um problema oposto de alteração da motilidade do trato gastrointestinal, mas não menos importante, uma vez que aproximadamente dois milhões de crianças ao redor do mundo morrem de diarreia. Nos países mais pobres, essa doença é a terceira causa mais comum de morte em crianças menores de 5 anos, ficando logo atrás das causas neonatais e da pneumonia (UNICEF, 2008). O número anual de mortes por diarreia em todo o mundo corresponde a aproximadamente o mesmo número de mortes por Síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), incluindo todas as faixas etárias (WHO, 2008).

O controle da motilidade no TGI é realizado por diversas vias atuantes no denominado Sistema Nervoso Entérico (SNE), tanto as classicamente descritas para os sistemas nervoso simpático e parassimpático, mediadas por noradrenalina e acetilcolina, como por outras vias moduladoras do trânsito gastrointestinal, com os neurotransmissores não-adrenérgicos e não-colinérgicos (NANC) (FURNESS; COSTA, 1987).

Diante dos aspectos acima destacados, torna-se evidente a importância da realização de estudos para avaliar a ação farmacológica de produtos naturais no TGI, visto que a identificação de novas substâncias que possam atuar alterando a motilidade do TGI oferece perspectivas de aplicação farmacológica.

## **1.1 Epidemiologia da diarreia**

A diarreia é definida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como três ou mais evacuações líquidas ou soltas em um período de 24 horas (OMS, 2009). Caracteriza-se também como um aumento na fluidez das fezes com a presença de sangue e muco nas mesmas (MATHAN, 1998). Desde a antiguidade, tem sido considerada um dos problemas de saúde mais importantes que afligem a



humanidade, principalmente populações com baixo nível socioeconômico, países em desenvolvimento e de terceiro mundo.

A doença diarreica afeta desproporcionalmente mais as crianças em países onde a renda varia de média a baixa, sendo uma das principais causas de mortalidade entre crianças menores de cinco anos de idade no mundo (BLACK et al., 2010). Problemas relacionados a sanitização da água e saneamento básico inadequado também contribuem para a elevada taxa de incidência da diarreia nesses países. Além disso, esses locais apresentam muitos fatores de risco nutricionais, como a não amamentação, culminando na deficiência de zinco e vitamina A (LAMBERTI et al., 2011). Pessoas que vivem em áreas pobres também têm taxas de letalidade mais elevadas devido à falta de acesso a cuidados de saúde de qualidade e tratamento eficaz, quando surge a doença (SANTOSHAM et al., 2010).

O conteúdo líquido é o principal determinante do volume e consistência das fezes, refletindo um equilíbrio entre a entrada luminal (ingestão e secreção de água e eletrólitos) e a saída ao longo do trato gastrointestinal. Os mecanismos neurohumorais, os patógenos, além de medicamentos podem alterar esses processos, resultando em mudanças na secreção ou absorção de fluidos pelo epitélio intestinal. A motilidade alterada também contribui de uma maneira geral para esse processo, assim como a extensão da absorção paralela ao tempo de trânsito (VITALI et al., 2006).

Durante episódio de diarreia ocorre redução da absorção ou uma hipersecreção de água juntamente com um aumento da motilidade intestinal, o que reduz a solidez das fezes. Essa mudança no fluxo de água é basicamente relacionada com um aumento na secreção de íons cloreto ( $\text{Cl}^-$ ) ou bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) e uma inibição na absorção de íons sódio  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  (FIELD; SEMRAD, 1993).

No que se refere à diarreia infecciosa, as enteropatogênias mais frequentes são aquelas relacionadas a infecções por *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Cyclospora*, *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium difficile*, calicivirus e outras vírus entéricos, anualmente, provocam mais de 200 milhões de casos de diarreia, nos Estados Unidos (GUERRANT et al., 2001).

## 1.2 Classificação das diarreias

A classificação da diarreia se dá por duas formas, quanto ao tempo ou aos seus aspectos clínicos. No que diz respeito ao tempo, a diarreia aguda pode ser autolimitada, com duração menor que duas semanas; persistente quando a diarreia dura 14 dias ou mais; e crônica se a duração dos sintomas for maior que um mês. De acordo com Amerine e Keirse, 2006, as diarreias são classificadas diarreia aguda, diarreia do viajante, diarreia osmótica e diarreia crônica.

### 1.2.1 Diarreia aguda

A Diarreia com duração de menos de duas semanas é considerada aguda (HALL, 2010), geralmente autolimitada e pode ser tratada rapidamente, sem sequelas. Esse tipo de diarreia é provavelmente causado por um agente infeccioso, tais como bactérias, parasitas ou vírus, ou por um agente não infeccioso, tais como alimentos ou até mesmo medicamentos (AMERINE; KEIRSEY, 2006).

As bactérias são frequentemente responsáveis pelos casos de diarreia aguda e pelas altas taxas de morbidade no mundo inteiro. A microflora intestinal é predominantemente composta por bactérias anaeróbicas, como aquelas dos gêneros *Eubacterium*, *Bifidobacterium* e *Clostridium*. Entretanto, a microflora subdominante é formada por bactérias aeróbicas ou anaeróbicas facultativas, como a *E. coli* e *Streptococcus* spp.; e o desbalanço na razão entre bactérias predominantes/bactérias subdominantes é associado ao desenvolvimento de diarreias (YIN et al., 2016).

Intoxicações alimentares resultantes da ingestão de bactérias ou de suas toxinas são frequentemente observadas em indivíduos de todas as idades, e uma grande quantidade de casos é provocada por bactérias dos gêneros *Eschericia* spp, *Salmonella* spp e *Shigella* spp, cujos sintomas envolvem além da diarreia, a febre e dor abdominal. Na maioria dos casos, o tratamento envolve apenas a reposição dos líquidos por meio da ingestão de água e do uso da terapia de reidratação oral (MESQUITA, 2014).

No que se refere às intoxicações por vírus, os rotavírus são os principais responsáveis por surtos de gastroenterites, que ocorrem, frequentemente, em locais em que há aglomeração humana, como escolas, creches e hospitais. Os sintomas

de infecção por rotavírus envolvem febre alta, náuseas e vômitos, acompanhados de diarreia aguda (LINHARES, 2000). Os tipos predominantes de rotavírus são G1, G2, G3 e G4. A doença geralmente evolui para a cura espontânea e o tratamento envolve apenas a reposição hidroeletrólítica, através do soro de reidratação oral ou, quando necessário, soro administrado por via parenteral (ARAÚJO et al., 2010).

Nas parasitoses, a contaminação geralmente se dá por ingestão de alimentos e água contaminados, em regiões, em sua maioria, sem acesso a saneamento básico, ou ainda através do contato fecal-oral (MOTTA; SILVA, 2002). Os protozoários mais comumente associados a eventos diarreicos são a *Giardia lamblia*, que propicia diferentes graus de dano à mucosa intestinal, resultando em deficiente digestão e má absorção de nutrientes, e o *Cryptosporidium parvum*, que provoca atrofia das vilosidades intestinais, provocando redução da área disponível para absorção (KATELARIS, 1992; CHACÍN-BONILLA, 1995). A giardíase costuma ser auto-limitada, tendo a cura em duas a quatro semanas, já a criptosporidíase costuma ser mais grave e requer o uso de antibióticos, como a espiramicina (40-50 mg/kg/dia) (FAFARD; LALOND, 1990).

### **1.2.2 Diarreia do viajante**

A diarreia do viajante é definida como a passagem de fezes não formadas 3 ou mais vezes por dia com um ou mais sintomas entéricos, como dor abdominal ou cólicas, ocorrendo em um viajante após a chegada, geralmente, em um destino com recursos limitados, como em países subdesenvolvidos (DUPONT, 2013).

As infecções por protozoários, helmintos e vírus correspondem a cerca de 30% dos casos detectados de diarreia do viajante, enquanto que de 50 a 80% são provocados por bactérias enteropatogênicas, sendo a bactéria *E. coli* a mais comumente identificada (WILDER-SMITH; BELKIND-GERSON, 2008).

### **1.2.3 Diarreia osmótica**

Diarreia osmótica Ocorre quando há grande quantidade de moléculas hidrossolúveis no lúmen intestinal, levando à retenção osmótica de água. Tem como causa mais frequente o uso de laxativos e a má-absorção intestinal de carboidratos. (KENT; BANKS, 2010)

A matéria fecal, em seguida, cria um gradiente osmótico negativo causando vazamento de mais fluido para dentro do intestino aumentando o volume das fezes (BLISS, 2006). A diarreia osmótica pode ser causada por diversos motivos, quais sejam: disponibilidade enzimática diminuída para a digestão (intolerância à lactose); anomalia genética que diminui ou elimina a capacidade do corpo para absorver certos nutrientes (doença celíaca); ingestão de açúcares que são fracamente absorvidos (como o sorbitol, manitol ou lactose); e má absorção de gorduras (STRASINGER; DI LORENZO, 2008).

Outras causas estão relacionadas com mudanças dentro do intestino, que diminui a capacidade de absorver líquidos e nutrientes. A má nutrição, especialmente a desnutrição proteico-calórica faz com que ocorra atrofia reversível da borda em escova e das vilosidades, estruturas responsáveis pela absorção intestinal, além de ressecamento de partes do intestino, especialmente do íleo terminal, o que vai mecanicamente diminuir a capacidade para absorver pela diminuição no comprimento disponível do intestino (BLISS et al., 2006).

#### **1.2.4 Diarreia crônica**

A diarreia crônica consiste em um quadro que geralmente perdura por mais de quatro semanas e no qual há redução significativa da consistência das fezes, o que causa mal-estar ou urgência abdominal, ou ainda um aumento na frequência de evacuações (SCHILLER et al., 2013).

A diarreia crônica do imunodeficiente é caracterizada por três ou mais episódios diarreicos por dia, febre alta, astenia, depressão e perda de peso. Uma grande diversidade de agentes etiológicos pode estar envolvida, incluindo: protozoários, como *Cryptosporidium parvum* e *Giardia lamblia*; bactérias, como *Escherichia coli* e *Campylobacter jejuni*; e fungos, como o *Histoplasma capsulatum* (MANZIONE et al, 2003).

A diarreia com má-absorção, como o espru tropical, desenvolve-se a partir de uma infecção intestinal resultante da ingestão de alimentos contaminados por enterobactérias e caracteriza-se por anormalidades estruturais e funcionais do intestino delgado, que progressivamente originam diarreia crônica e deficiências nutricionais (VELARDE; EDUARDO, 1997).

A diarreia sem má-absorção, como a síndrome do intestino irritável, é caracterizada por distúrbios da motilidade gastrointestinal, por alterações na regulação mediada pelo sistema nervoso central, assim como por hipersensibilidade visceral. Os sintomas dependem do tipo de síndrome do intestino irritável, se tipo I ou II, mas, em geral, resultam em uma alteração da motilidade intestinal, com alternância de eventos de constipação e diarreia, além de dor abdominal (MOURÃO; DAMIÃO; SIPAHI, 2002).

### **1.3 Tratamento medicamentoso da diarreia**

As drogas antidiarreicas reduzem os sinais e sintomas da doença, aumentando a consistência das fezes e reduzindo a frequência de defecação. Sua ação é produzida através de efeitos sobre o trânsito intestinal, o transporte através da mucosa, ou modificando o conteúdo da luz intestinal (RANG et al., 2006). Opções de fármaco para o tratamento de diarreias incluem os antagonistas dos receptores da serotonina (5-HT<sub>2</sub> e 5-HT<sub>3</sub>), antagonistas do sistema cálcio-calmodulina, agonistas dos receptores opióides sigma, e o inibidor da encefalinase, racecadotril (FARTHING, 2000).

Existem substâncias utilizadas alterar a motilidade gastrointestinal, em que para diminuir a motilidade podem ser utilizados opiáceos (ex: loperamida) e antagonistas dos receptores muscarínicos (ex: escopolamina e atropina), enquanto para aumentar a motilidade são utilizadas a domperidona, a metoclopramida e a cisaprida. Contudo, todas possuem efeitos colaterais indesejáveis associados ao seu uso (CHEN, 2010).

A terapia de reidratação oral tem sido de grande importância no manejo das diarreias e para salvar, mas novos métodos para o tratamento da diarreia ainda estão sendo explorados (SCHILLER; SELLIN, 2006).

Neste sentido, a OMS tem encorajado fortemente os estudos para o tratamento e prevenção das doenças do sistema digestório com o uso de práticas da medicina tradicional, fazendo com que as plantas medicinais tornem-se um dos mais promissores instrumentos na prática para o combate das doenças do trato gastrointestinal (TGI) (LUTTERODT, 1989).

As doenças gastrintestinais são um grave problema de saúde pública em todo o mundo, e podem afetar até 70% da população em geral (CHEN, 2010).

Existem ainda outras conhecidas doenças do trato gastrointestinal além da diarreia que merecem destaque, entre as quais estão: Constipação, Íleo Pós-Operatório e Dispepsia Funcional.

A constipação é um dos distúrbios gastrintestinais mais comuns vistos por gastroenterologistas e médicos do Atendimento Primário de Saúde. A constipação acomete ambos os sexos e classes sociais, no entanto, é mais frequente em mulheres e em populações socioeconômicas mais baixas (CHENG et al., 2009). Existem dois tipos de constipação; aguda ou crônica, sendo a constipação crônica definida como aquela com duração superior a três meses (GUERRANT, 2001).

O Íleo Pós-Operatório representa uma disfunção transitória da motilidade intestinal, que se caracteriza como um padrão anormal de motilidade gastrintestinal, que ocorre mais frequentemente após cirurgia abdominal. Tem como principais sinais ou sintomas; náuseas e vômitos, incapacidade de tolerar uma dieta oral, distensão abdominal e passagem tardia de flatos e fezes. (MATTEI; ROMBEAU, 2006).

A dispepsia funcional configura-se por plenitude pós-prandial, saciedade precoce e dor epigástrica e queimação (TACK et al., 2006), podendo ainda provocar azia, inchaço e desconforto (STANGHELLINI et al., 2003). Embora estudos recentes tenham investigado vários mecanismos fisiopatológicos, a patogênese da dispepsia funcional permanece obscura.

#### **1.4 Importância dos modelos experimentais de estudos de motilidade gastrointestinal**

Os estudos de motilidade intestinal e esvaziamento gástrico permitem investigar o potencial uso de alguma substância no tratamento de afecções do trato gastrointestinal, tratando desde distúrbios que envolvam um aumento no esvaziamento gástrico, na secreção e na motilidade intestinal até estudos que envolvam redução desses processos. Neste sentido, alguns modelos de diarreia são amplamente utilizados e baseiam-se na utilização de óleo de rícino e de análogos da prostaglandina E<sub>2</sub> (SALES, 2014).

O óleo de rícino é capaz de produzir diarreia em virtude de sua hidrólise intestinal, realizada através da ação de lipases, gerando glicerol e um metabólito ativo, o ácido rinoléico, que por sua vez promove a inflamação da mucosa e

secreção de água e eletrólitos no intestino delgado, resultando em alteração da motilidade intestinal e, com isso, diarreia (LEITE et al., 2014).

A prostaglandina E<sub>2</sub> promove diarreia através do aumento da atividade da adenilato ciclase na mucosa intestinal, com consequente aumento do AMP cíclico, modificando o transporte intestinal de água e eletrólitos, além de aumentar a motilidade (RACHMILEWITZ, 1980).

No que se refere a avaliação da motilidade normal ou alterada, frequentemente são utilizados modelos experimentais com marcadores do trânsito gastrointestinal, tais como o carvão ativado e o vermelho de fenol, em que após a administração dos marcadores a animais previamente tratados com extratos ou substâncias em testes, é realizada a avaliação de presença ou não de alteração do trânsito gastrointestinal pela medida do deslocamento do marcador ao longo do trato gastrointestinal (SALES, 2014).

### **1.5 Produtos naturais derivados de plantas e compostos isolados naturais ou sintéticos no manejo da diarreia**

A cura através de plantas é uma prática milenar que faz parte da história do homem (LOUREIRO, 2012). As primeiras civilizações tomaram conhecimento da existência de plantas comestíveis que possuíam um potencial curativo (CUNHA; RIBEIRO; ROQUE, 2009). A utilização de produtos de origem vegetal é crescente em todo o mundo, principalmente devido aos possíveis danos tanto para a saúde quanto para o meio ambiente atribuídos aos produtos sintéticos (MACHADO; FERNANDES JÚNIOR, 2011).

No Brasil existe uma grande diversidade de biomas que é muito pouco explorada como fonte de novas substâncias de interesse farmacêutico, e as pesquisas para a descoberta de protótipos de fármacos e também de fitofármacos tem propiciado além do avanço da pesquisa, o desenvolvimento tecnológico do país (BARREIRO; BOLZANI, 2009).

Os produtos naturais derivados de plantas são consideradas um caminho promissor para a descoberta de novas substâncias com atividade farmacológica. No desenvolver da humanidade o processo evolutivo induziu que as mesmas gerassem compostos de valor adaptativo, os metabólitos secundários. Muitos desses metabólitos estão diretamente envolvidos em mecanismos que permitem a

adequação da planta ao seu meio (SIMÕES et al., 2004), uma vez que esses compostos podem proteger as plantas de fungos, vírus, insetos e predadores herbívoros (NAHRSTEDT, 1989; HARBONE, 1990), ou podem ajudá-las na reprodução, atraindo polinizadores.

As plantas e seus derivados apresentam uma variedade de ações terapêuticas e representam uma promissora fonte para a busca de novas alternativas farmacológicas. Nesse sentido, aliar o conhecimento popular ao científico em busca de novos medicamentos tem se tornado uma grande estratégia e um dos principais caminhos para o sucesso de pesquisas na área de plantas medicinais (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002). A OMS ressalta que devido à pobreza ou falta de acesso aos medicamentos modernos, cerca de 60 a 80% da população dos países em desenvolvimento dependem essencialmente das plantas para os cuidados primários com a saúde (FABRICANT; FARNSWORTH, 2001).

Dessa forma, pode-se afirmar que o desenvolvimento de fitoterápicos padronizados com eficácia e segurança de uso comprovados, constitui uma ferramenta importante para assegurar acesso da população aos medicamentos, assim como para oferecer novas opções terapêuticas diante da problemática atual que são os efeitos colaterais abundantes apresentados por muitos fármacos de origem sintética.

## 1.5 Mentofurano

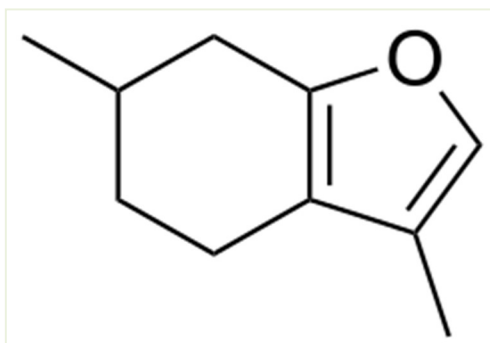
O gênero *Mentha*, família Lamiaceae, é um dos mais complexos do reino vegetal, contando com 19 espécies e 13 híbridos resultantes do cruzamento espontâneo e seleção das espécies (NILO, 2015). A menta (*Mentha piperita* L.), conhecida no Brasil como hortelã, hortelã-pimenta e menta-inglesa, é uma planta herbácea originária da Europa e da Ásia, com grande utilização medicinal (GRISI, 2006). Essa espécie também é fonte de um dos mais populares óleos essenciais, com diversas aplicações nas indústrias de alimentos, cosmética e farmacêutica. Os mais importantes constituintes do óleo de hortelã-pimenta são: mentol, mentona, mentofurano, acetato de mentila e pulegona (AFLATUNI, 2005). A composição qualitativa e quantitativa nesses monoterpenoides determina a qualidade e o valor comercial do óleo essencial (BEHN et al., 2010).



O mentofurano ( $C_{10}H_{14}O$ ) é um produto monoterpenóide é um dos componentes do óleo essencial de plantas da família *Lamiaceae*. A acumulação de mentofurano é altamente dependente das condições ambientais, e a produção desse metabólito é aumentada por fatores como: altas temperaturas do dia; altas temperaturas de noite; baixas densidades de fluxo de fótons; dias curtos e estresse hídrico (CLARK et al., 1980).

Embora existam algumas outras fontes naturais de mentofurano além da *M. piperita*, tal como a *M. aquatica* (Aqua hortelã, que tem uma limitada distribuição), a maior parte da procura industrial para a molécula é realizada através de mentofurano sintético (derivado de isopulegol) (AKERELE,1993). O estudo do potencial farmacológico da molécula de mentofurano é muito importante, pois visa a procura de tratamentos alternativos para variadas disfunções, dentre as quais podem ser citados os distúrbios gastrointestinais. A figura 1 apresenta a estrutura da molécula de mentofurano.

Figura 1. Estrutura química do Mentofurano



Fonte: chemspider.com

# Objetivos

## 2 OBJETIVOS

### 2.1. Geral

- ✓ Investigar o efeito hipocinético do mentofurano no trato gastrointestinal de roedores

### 2.2. Específicos

- ✓ Avaliar a toxicidade aguda *in vivo*.
- ✓ Determinar o efeito do mentofurano no esvaziamento gástrico em ratos;
- ✓ Avaliar o efeito do mentofurano no trânsito intestinal normal em camundongos;
- ✓ Demonstrar ação antidiarreica do mentofurano em modelo de hipermotilidade intestinal provocada por óleo de rícino;
- ✓ Identificar os possíveis mecanismos de ação envolvidos nos efeitos farmacológicos sobre a motilidade gastrintestinal apresentados pelo mentofurano;
- ✓ Avaliar o efeito espasmolítico do mentofurano *in vitro*.

# **Material e métodos**

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Obtenção do mentofurano**

O mentofurano (3,6-dimetil-4,5,6,7-tetrahydrobenzofurano, Sigma, 17957-94-7) foi fornecido pelo professor Damião Pergentino de Sousa, membro-docente do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal da Paraíba.

#### **3.2. Animais**

Foram utilizados quatro ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos, adultos (180 - 200 g), 35 ratos fêmeas (180 - 200 g), e 100 camundongos Swiss machos e fêmeas (20-30 g) provenientes do Biotério do Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais da Universidade Federal do Piauí (NPPM/UFPI). Os animais foram mantidos com livre acesso a ração comercial para roedores (Purina) e água, em sala climatizada com temperatura de  $27 \pm 2$  °C, sistema de exaustão de ar e ciclo claro escuro de 12 h.

Os procedimentos descritos seguiram os princípios éticos de experimentação animal definidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e as normas para prática didático-científica de dissecação animal, obedecendo ao Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O projeto foi, previamente ao início dos experimentos, submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFPI sob o protocolo de número 086/15.

#### **3.3. Protocolos experimentais**

##### **3.3.1. Avaliação de toxicidade aguda do mentofurano**

Camundongos Swiss machos (20-30 g) foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos contendo seis animais cada um, sendo o controle tratado com veículo (tween 80 0,1%) e o grupo mentofurano tratado com dose de 2.000 mg/kg. O tratamento foi realizado em dose única e os animais foram observados por até 8 horas no primeiro dia do tratamento, e a partir daí diariamente por 14 dias. Os parâmetros avaliados foram: estado de alerta, sedação, ptose palpebral, dispneia,

micção, diarreia, convulsão, atividade motora espontânea, reflexo postural, piloereção, resposta ao tato e morte, dentre outros. A toxicidade aguda foi avaliada com base no número de mortes, de acordo com o protocolo 420 (método da dose fixa) da *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD, 2001)

### 3.3.2 Avaliação do efeito do mentofurano sobre o esvaziamento gástrico pelo método do corante vermelho de fenol

Os animais foram aclimatizados individualmente por 4 dias, em gaiolas metabólicas para evitar coprofagia e mantidos em condições padronizadas, conforme descrito no item 3.1.1. A ração, mas não a água, foi retirada 18 horas antes dos experimentos. Inicialmente, os ratos fêmeas (n=7/grupo) foram tratados por via oral com solução de água e carboximetilcelulose a 2% (5 mL/kg), mentofurano 25, 50 ou 100 mg/kg ou com escopolamina 10 mg/kg. Uma hora depois dos tratamentos, os animais receberam por via oral 1,5 mL de alimento líquido composto de vermelho de fenol 0,5 mg/mL em solução de glicose a 5 g% e, passados mais 20 minutos, foram eutanasiados. Após ampla laparotomia, o cárdia, o piloro e a junção ileocecal foram ligados, e o conjunto estômago e intestino delgado foram retirados e separados em duas partes: intestino delgado e estômago. Cada parte foi fragmentada e colocada em 45 mL de solução 0,1 N de NaOH e mantida em banho maria a 80°C sob leve agitação durante uma hora. Amostras de 5 mL das suspensões foram misturadas com 0,5 mL de solução de ácido tricloroacético a 20% e centrifugadas por 10 min a 3.000 rpm para a precipitação de proteínas. A seguir, alíquotas de 1 mL dos sobrenadantes foram misturadas com 2 mL de NaOH 0,5 N para promover a completa conversão do vermelho de fenol à forma básica. A concentração do indicador foi determinada por comparação espectrofotométrica da leitura da absorbância (560 nm) das amostras. A retenção gástrica (RG) do vermelho de fenol foi calculada dividindo-se a quantidade do corante encontrada no estômago pela quantidade total encontrada nos dois segmentos (estômago e intestino delgado) e expressa em percentagem. O esvaziamento gástrico (EG) foi calculado e expresso em percentagem (%) pela fórmula:  $[EG = 100 - RG]$ .

### 3.3.3 Avaliação do efeito do mentofurano no trânsito intestinal no modelo do carvão ativado em camundongos.

Os animais foram aclimatizados individualmente por, no mínimo, 4 dias, em gaiolas metabólicas para evitar coprofagia e mantidos em condições padronizadas, conforme descrito no item 3.1.1. A ração, mas não a água, foi retirada 18 horas antes dos experimentos. Os camundongos (n=8/grupo) foram tratados por via oral com veículo no grupo controle (0,1 mL/10 g de tween 80 a 0,1%) ou mentofurano (25, 50 ou 100 mg/kg) nos grupos experimentais ou escopolamina 12 mg/kg no grupo padrão. Trinta minutos após os tratamentos, os animais receberam, por via oral, suspensão aquosa de carvão vegetal ativado 2,5% e carboximetilcelulose 3% na dose de 1 mL/100 g e, após mais 30 minutos, foram eutanasiados. A seguir, o piloro foi ligado e o intestino delgado de cada animal retirado e distendido, sendo o trânsito intestinal avaliado pela determinação da distância percorrida pelo carvão em 30 min do piloro até a última porção do intestino que continha pelo menos 1 cm contínuo de carvão e expressa como porcentagem do comprimento total do intestino delgado.

### 3.3.4. Avaliação do efeito do mentofurano sobre a hipermotilidade intestinal induzida por óleo de rícino em camundongos.

Os animais foram aclimatizados individualmente por, no mínimo, 4 dias, em gaiolas metabólicas para evitar coprofagia e mantidos em condições padronizadas conforme descrito no item 3.1.1. A ração, mas não a água, foi retirada 18 horas antes dos experimentos e os animais distribuídos em 6 grupos de oito animais. Os animais do primeiro grupo foram tratados, por via oral com água e os demais com óleo de rícino (0,1 mL/animal). Passados 30 minutos, os animais do primeiro (controle não-diarréico) e os do segundo grupo (controle diarreia) receberam (0,1 mL/10 g de tween 80 a 0,1%) Os quatro outros grupos receberam mentofurano (25, 50 ou 100 mg/kg) e loperamida 6 mg/kg (grupo padrão). A seguir, os animais foram acompanhados individualmente por 4 horas, efetuando-se a quantificação da excreção de fezes sólidas e líquidas inicialmente a cada trinta minutos, a fim de avaliar a severidade da diarreia provocada pelo óleo de rícino.

### 3.3.5 Avaliação da atividade espasmolítica do mentofurano em Íleo isolado

Ratos albinos Wistar machos (n=4), pesando de 180 a 200 g, foram mantidos em gaiolas metabólicas por quatro dias e, em seguida, submetidos ao jejum de ração, mas não de água, nas 18 horas que antecederam o experimento. No dia do experimento, os animais foram eutanasiados e os íleos distais foram removidos e colocados em placas de Petri com solução de Krebs modificada e aerada com mistura carbogênica (95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>). Fragmentos do íleo (2-3 cm) foram seccionados e suspensos por linhas de algodão, fixadas a um transdutor de força acoplado a um sistema de aquisição (AECAD 1604, AQCAD 2.0.5., AVS Projetos, SP) em uma cuba de vidro contendo 10 mL de solução nutritiva de Krebs modificada, deixados a estabilizar por 30 minutos. Posteriormente, foram induzidas duas contrações de magnitudes similares por meio dos agentes contraturantes carbacol (1 µM) e KCl (40 Mm) em preparações diferentes. Após a estabilização da segunda contração tônica induzida por um dos agentes contráteis, o mentofurano foi adicionado em concentrações crescentes e cumulativas para verificação do efeito espasmolítico no íleo contraído. Quanto aos valores de CE<sub>50</sub> (concentração na qual uma substância induz metade do efeito máximo) do mentofurano necessários para induzir relaxamento do íleo, na presença do carbacol ou KCl, foram expressos como média ± erro padrão da média em µg/mL dos valores resultantes de cada experimento.

### 3.4 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média ± erro padrão da média. A análise estatística dos protocolos de esvaziamento gástrico, trânsito e hipermotilidade intestinais foi realizada por meio de análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Tukey, enquanto os valores de CE<sub>50</sub> foram calculados por regressão não-linear para atividade espasmolítica em íleo isolado e as médias comparadas por teste t de *student* não-pareado. Os dados foram analisados utilizando-se o software GraphPad Prism, versão 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, U.S.A.). O nível de significância foi estabelecido em p<0,05.



# **Resultados**

## 4 RESULTADOS

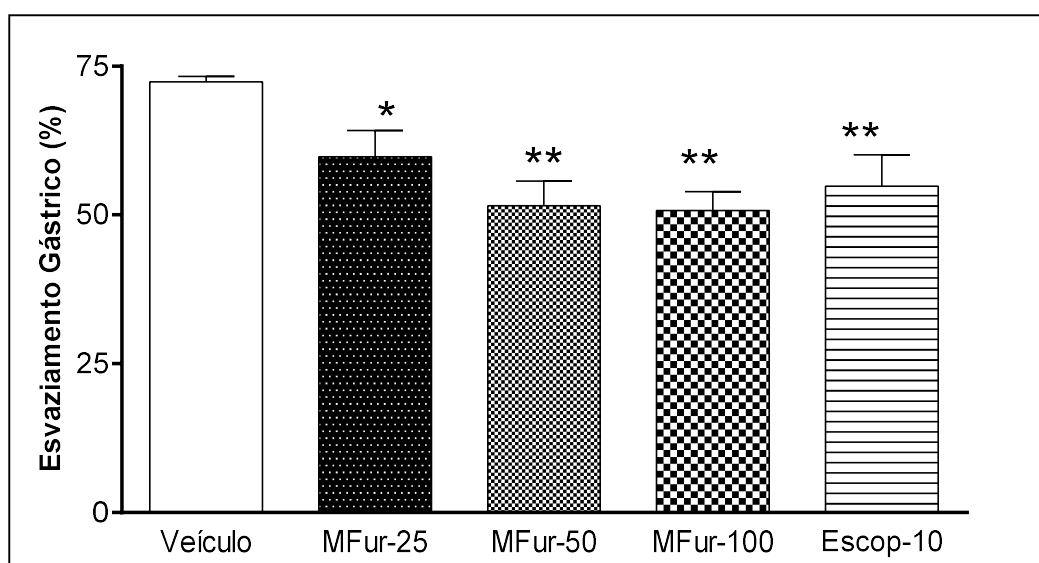
### 4.1 Avaliação de toxicidade aguda do mentofurano

Após administração de dose de 2.000 mg/kg v.o. de mentofurano não houve mortes nem alterações de comportamento ou de quaisquer dos parâmetros dos parâmetros avaliados durante o tempo de observação de 14 dias. Esses resultados indicam ausência de toxicidade aguda sistêmica do mentofurano e, considerando a ausência de mortes, não foi possível determinar a dose letal média (DL50).

### 4.2 Efeito do mentofurano sobre o esvaziamento gástrico

No modelo de avaliação do esvaziamento gástrico com vermelho de fenol, o grupo controle apresentou média de esvaziamento (%) igual a  $72,1 \pm 1,3$ . A administração do mentofurano por via oral nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg promoveu redução significativa do esvaziamento gástrico ( $p < 0,01$ ) em relação ao grupo controle. Não houve diferença estatisticamente significativa entre percentual médio de esvaziamento gástrico dos grupos tratados com mentofurano e o grupo padrão, tratado com escopolamina 10 mg/kg ( $54,8 \pm 5,3$ ) (Figura 2).

**Figura 2.** Efeito do tratamento com mentofurano por via oral nas doses de 25 mg/kg (MFur-25), 50 mg/kg (MFur-50) e 100 mg/kg (MFur-100) e da escopolamina 10 mg/kg (Escop-10) sobre o esvaziamento gástrico pelo método vermelho de fenol em ratos.

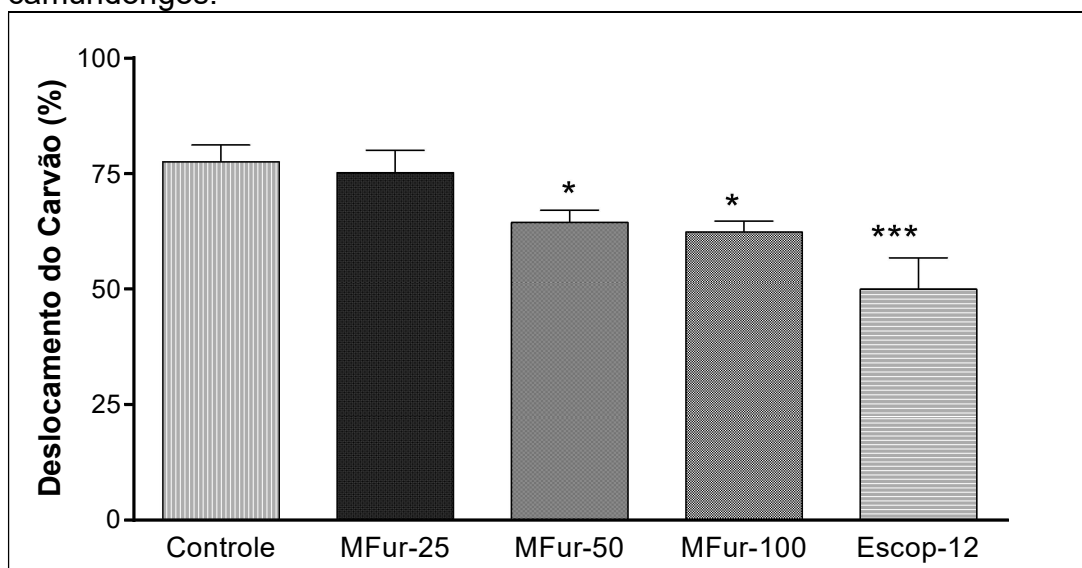


Cada coluna representa média  $\pm$  EPM (Erro padrão da média) ( $n = 7$  animais/grupo). \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$  comparados ao veículo (One Way ANOVA/ Tukey).

### 4.3 Efeito do mentofurano no trânsito intestinal

Ao avaliar o efeito do mentofurano no trânsito intestinal normal em camundongos (Figura 3), observou-se redução estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) do trânsito intestinal nos grupos tratados com mentofurano (50 e 100 mg/kg) quando comparados com o grupo controle. O grupo tratado com escopolamina também apresentou trânsito intestinal significativamente menor ( $50,0 \pm 6,8$ ;  $p < 0,001$ ) em relação ao grupo controle ( $77,6 \pm 3,6$ ); contudo, sem diferenças em relação aos grupos tratados com mentofurano nas doses de 50 e 100 mg/kg (MFur-50:  $64,5 \pm 2,6$ ; MFur-100:  $62,4 \pm 2,4$ ).

**Figura 3.** Efeito do tratamento com mentofurano por via oral nas doses de 25 mg/kg (MFur-25), 50 mg/kg (MFur-50) e 100 mg/kg (MFur-100) e da escopolamina 12 mg/kg (Escop-12) sobre o trânsito intestinal normal em camundongos.



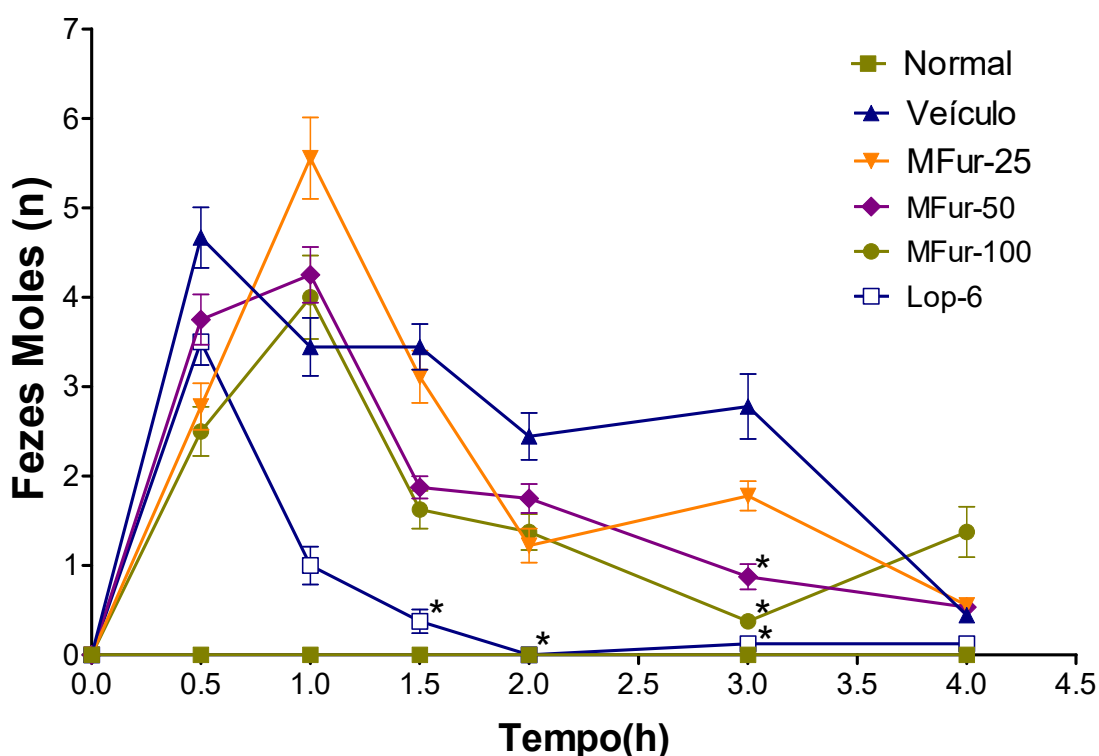
Cada coluna representa média  $\pm$  EPM (Erro padrão da média). (n=8 animais/grupo)  
 \*\*\* $p < 0,001$ ; \* $p < 0,05$  comparados ao veículo (One Way ANOVA/ Tukey).

### 4.4 Efeito do mentofurano em modelo de hipermotilidade intestinal provocada por óleo de rícino

Ao avaliar o efeito antidiarreico por meio da quantificação das fezes moles eliminadas (Figura 4), o tratamento com óleo de rícino promoveu aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da excreção em todos os grupos quando comparados com o grupo normal (sem diarreia) na primeira hora de tratamento. O mentofurano nas doses de 50 e 100 mg/kg (v.o) reduziu significativamente ( $p < 0,05$ ) a quantidade

das fezes moles eliminadas na terceira hora quando comparados ao grupo veículo (diarreico), sem diferença estatística em relação ao grupo normal (não diarreico).

**Figura 4.** Efeito do mentofurano – Mfur (25, 50, e 100 mg/kg) e da loperamida (6 mg/kg) sobre a eliminação de fezes moles 30, 60, 90 min e 2, 3 e 4 h após indução de hipermotilidade intestinal por óleo de rícino em camundongos.



Valores expressos como média  $\pm$  EPM (Erro padrão da média) (n=8 animais/grupo). \* $p < 0,05$  comparado ao veículo (One Way ANOVA/ Tukey).

O grupo tratado com loperamida apresentou redução estatisticamente significativa da excreção de fezes moles quando comparado ao grupo veículo ( $p < 0,05$ ) a partir de uma hora e meia do tratamento, sem diferenças estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ) em relação ao tratamento mentofurano 100 mg/kg, v.o.), na terceira hora. Conforme apresentado na Tabela 1, o mentofurano na dose de 100 mg/kg e a loperamida reduziram significativamente a eliminação total de fezes moles ao longo das 4 horas de observação, com excreção total, respectivamente, de  $11,36 \pm 2,07$  e  $4,79 \pm 0,75$ . Esses resultados representam inibição de 34,4% pelo mentofurano 100 mg/kg e de 72,3% pela loperamida 6 mg/kg.

**Tabela 1** – Efeito do mentofurano (25, 50, e 100 mg/kg) e da loperamida (6 mg/kg) sobre a hipermotilidade intestinal induzida por óleo de ricino em camundongos.

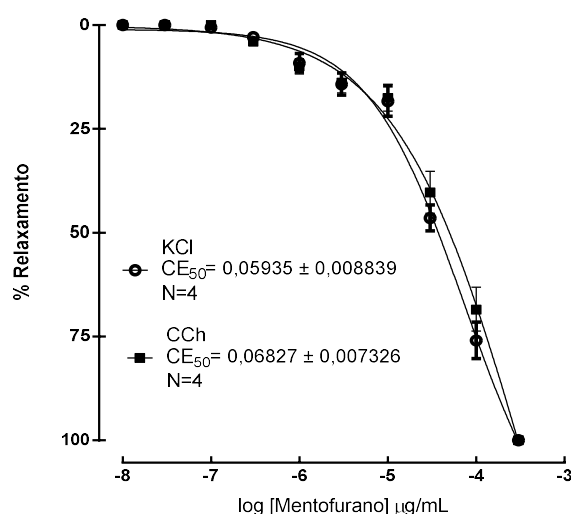
Tratamento	n	Dose	Eliminação de fezes moles (n/4 h; Média ± EPM)	Inibição da diarreia (%)
Normal	8	---	0,13 ± 0,13	---
Veículo	8	10 mL/kg	17,31 ± 1,94	0,0
Mentofurano	8	25 mg/kg	15,00 ± 1,04	NS
	8	50 mg/kg	12,93 ± 1,15	NS
	8	100 mg/kg	11,36 ± 2,07*	34,4
Loperamida	8	6 mg/kg	4,79 ± 0,75***	72,3

NS: Não significativo; (\*\*\*)  $p < 0,001$ ; (\*)  $p < 0,05$  comparados ao grupo controle (ANOVA e teste de Newman Keuls).

#### 4.5 Avaliação da atividade espasmolítica do mentofurano em íleo isolado

O mentofurano nas concentrações de  $10^{-8}$  a  $10^{-3}$   $\mu\text{g/mL}$  ( $n = 4$ ) produziu significativo relaxamento, dependente de concentração, em íleo de ratos pré-contraídos com KCl ou carbacol (Figura 5). Quanto à potência, o mentofurano apresentou potências semelhantes para relaxamento do íleo, não tendo sido observadas diferenças estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ) entre as concentrações necessárias para promover relaxamento por KCl ( $CE_{50} = 0,059 \pm 0,008 \mu\text{g/mL}$ ) ou carbacol ( $CE_{50} = 0,068 \pm 0,007 \mu\text{g/mL}$ ).

**Figura 5.** Efeito mentofurano em concentrações variando de  $10^{-8}$  a  $10^{-3}$   $\mu\text{g/mL}$  sobre a contração induzida por carbacol (CCh)  $10^{-6}$  e KCl 40mM em segmentos isolados de íleo de rato.



Valores expressos como média ± EPM (Erro padrão da média) de experimentos realizados em triplicata.

# **Discussão**

## 5 DISCUSSÃO

Os monoterpenos são compostos químicos derivados do metabolismo secundário de espécies vegetais, sendo os principais constituintes de óleos essenciais de hortelã (*Mentha piperita*). O crescente interesse na aplicação clínica destes compostos é propriedades biológicas de terpenos, tais como efeito antitumoral, antimicrobiano, antifúngico, antiviral, anti-hiperglicêmico, analgésico, anti-inflamatório e antiparasitário (MAHMOUD, 2003; PADUCH et al., 2007; DEWICK, 2009). Considerando que existem poucos estudos sobre o mentofurano, buscou-se investigar a atividade desse monoterpeno em modelos de motilidade gastrointestinal.

Inicialmente foi avaliada a toxicidade aguda do mentofurano e foi possível observar que esse monoterpeno apresentou baixa toxicidade aguda sistêmica evidenciada pela ausência de mortes, de alterações de comportamento ou de quaisquer dos parâmetros avaliados durante o tempo de observação de 14 dias, não sendo possível a determinação da dose letal média (DL50). Entretanto, outros estudos de toxicidade realizados com diversos monoterpenos, inclusive com o mentofurano, são divergentes quanto a esse aspecto

Bordignon et al. (1997) e Thomassen et al. (1992) descreveram uma alta toxicidade associada aos metabólitos gerados pela biotransformação do mentofurano, os quais são capazes de se ligarem a proteínas celulares de maneira covalente e também de reduzirem os níveis das enzimas da superfamília do citocromo P450, que metabolizam xenobióticos, resultando em hepatotoxicidade e morte. Em relação à toxicidade crônica de monoterpenos, Baibars et al. (2012) relataram efeitos tóxicos relacionados a exposição crônica ao mentol, um dos monoterpenos isolados da menta (*Mentha piperita* L.), ocasionando manifestações cutâneas (lesões cutâneas maculares), neurológicas (tontura e perda de consciência) e gastrointestinal (diarreia).

Em contrapartida, Khalil, Elkatry e El Mehairy (2015) observaram que o óleo essencial da menta teve um efeito protetor contra a hepatotoxicidade induzida por tetracloreto de carbono, aumentando a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e glutatona, além de reduzir os níveis de malondialdeído, um marcador de dano celular por estresse oxidativo. Costa et al. (2012) após investigar a toxicidade da ciano-carvona, um monoterpeno obtido da *Mentha spicata*, observou

ausência de mortes nos 14 dias após administração da droga, bem como alterações discretas no estado de consciência, sistema motor e muscular e nenhuma alteração morfológica de órgãos importantes. De modo semelhante, os achados deste estudo identificaram a ausência de toxicidade aguda do mentofurano, o que indica possível segurança quanto a sua aplicação farmacológica em uso agudo e em baixas doses, como aquelas utilizadas neste estudo. Contudo, há necessidade de estudos adicionais de toxicidade deste monoterpeneo.

As desordens do esvaziamento gástrico estão entre as principais afecções do trato gastrointestinal, que podem ser assintomáticas ou estarem relacionadas a sintomas que variam de toleráveis a incapacitantes (FIRMAN et al., 2000). Para avaliação do peristaltismo do trato gastrointestinal foram utilizados os modelos de esvaziamento gástrico e motilidade intestinal. Em modelo de esvaziamento gástrico utilizando vermelho de fenol, o mentofurano nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg reduziu o esvaziamento gástrico comparados, sem diferença nas diferentes doses quando comparado a escopolamina, sugerindo que o mentofurano apresenta potencia semelhante a deste fármaco, utilizado como padrão. No modelo de trânsito intestinal pelo método do carvão ativado, o mentofurano nas doses de 50 e 100 mg/kg reduziu o trânsito intestinal, sem diferenças entre o efeito obtido nas duas doses com aquele produzido pela escopolamina.

A escopolamina é um antagonista natural de receptores muscarínicos dos subtipos M1 e M2, que exerce atividade espasmolítica sobre a musculatura lisa do trato gastrintestinal. Ademais, os antagonistas muscarínicos provocam efeito inibidor prolongado na atividade motora do estômago (ZUI et al., 2010), o que explica o seu efeito nos modelos experimentais anteriores.

Diversos estudos avaliaram os efeitos de óleo essencial de menta sobre o esvaziamento gástrico. Hiki et al. (2003) observaram que o óleo essencial de menta foi capaz de reduzir os espasmos gástricos durante endoscopia digestiva alta. Asao et al. (2001) também avaliaram a efetividade do óleo de menta em reduzir os espasmos do cólon durante colonoscopia e observaram efeito espasmolítico em 88,5% dos pacientes tratados, demonstrando que esse óleo pode constituir-se em uma alternativa ao uso convencional de bloqueadores colinérgicos durante esse procedimento. Em um estudo farmacodinâmico, Goerg e Spilker (2003) demonstraram que o óleo essencial de menta promoveu redução do trânsito do intestinal e relaxamento da vesícula biliar em indivíduos saudáveis. Por outro lado,



Alam et al (2013), ao avaliarem a eficácia do desse óleo em pacientes com síndrome do intestino irritável que apresentavam diarreia, observaram uma redução da dor, mas não de outros sintomas.

Tendo em vista que, fisiologicamente, o peristaltismo gastrointestinal é regulado pela liberação do neurotransmissor acetilcolina, que atua sobre receptores muscarínicos e promove o peristaltismo, entre os possíveis mecanismos de ação do mentofurano para modificar a motilidade intestinal, estão atuação: (1) como antagonista de receptores muscarínicos, subtipo M3, resultando em redução da atividade da acetilcolina sobre o trato gastrointestinal e com isso em redução do peristaltismo; (2) como agonista dos receptores opióides, agindo sobre receptores  $\mu$  gastrointestinais, o que resultaria em inibição da liberação de adenilil ciclase e diminuição do monofosfato de adenosina cíclico (AMP cíclico) intracelular e posterior redução da liberação do neurotransmissor acetilcolina, inibindo o peristaltismo intestinal (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012); ou (3) como um bloqueador de canais de  $Ca^{2+}$  sensíveis à voltagem, resultando em inibição da contração da musculatura lisa, uma vez que a abertura desses canais é o evento mais importante para a completa despolarização e consequente contração da musculatura intestinal (SOMLYO; SOMLYO, 2003; BEST; BROOKS; BOLTON, 1985).

A aceleração da motilidade intestinal resulta em alteração do trânsito e, dessa forma, vários processos geralmente estão envolvidos simultaneamente e resultam em aumento global do peso e do volume das fezes e elevação da percentagem de água fecal (GRUNDY et al., 2006). Quando avaliada possível atividade antidiarréica do mentofurano em modelo de hiperomotilidade intestinal provocada por óleo de rícino, observou-se que as doses de 50 e 100 mg/kg (v.o) reduziram, de maneira dose dependente, a quantidade das fezes moles eliminadas na terceira hora em relação ao grupo veículo (diarreico), sem diferença quando comparado ao grupo normal (não diarreico), que indica que o metofurano apresenta atividade antidiarreica.

A ação antidiarreica de diversos terpenos foi avaliada em outros estudos. Ao analisar os efeitos do mentol em um modelo de diarreia induzida por óleo de rícino, Rozza et al. (2013) observaram que este apresentou efeito comparável à loperamida, reduzindo o número de fezes moles, portanto, apresentando efeito antidiarreico. Em outro estudo, Bustos-Brito et al. (2014) observaram que um composto derivado do timol, um monoterpene, isolado da *Agerantina cylindrica*

demonstrou atividade inibitória sobre movimentos hiperperistálticos induzidos por carvão vegetal associado a goma arábica, em ratos. Negi et al. (2013) investigaram e identificaram que o extrato metanólico do óleo essencial da *Saussurea lappa* C., que tem sesquiterpenos como constituintes majoritários, possui atividade antidiarreica similar ao difenoxilato, em modelo diarreia induzida por óleo de rícino.

O mecanismo pelo qual o óleo de rícino induz diarreia envolve a ação de um metabólito ativo, o ácido ricinoleico, que é formado por hidrólise no intestino e promove inflamação da mucosa e secreção de água, além de alteração da permeabilidade a eletrólitos no intestino delgado, resultando em aumento da motilidade intestinal (NIGATU, 2004). Nesse sentido, o mentofurano pode apresentar ação antidiarreica por redução da secreção de água e eletrólitos ou ainda por alteração do peristaltismo gastrointestinal.

Após a realização dos estudos *in vivo*, a atividade do mentofurano sobre o peristaltismo intestinal foi avaliada utilizando-se modelo de contração tônica *in vitro* com segmentos de íleo de ratos, com a finalidade de identificar a possível razão do seu efeito espasmolítico. No presente estudo, o mentofurano foi capaz de promover o relaxamento do íleo pré-contraído tanto por KCl como por carbacol, de maneira dose-dependente e sem diferenças entre os dois testes, sugerindo que este efeito pode ter envolvimento da ativação de canais de potássio e/ou de redução do influxo de cálcio.

Hills e Aaronson (1991) investigaram o mecanismo de ação do óleo essencial de menta sobre preparações de intestino grosso de cobaias e em *patch clamp* do jejuno de coelhos, e observaram que houve relaxamento da musculatura lisa por redução do influxo de cálcio. Em outro estudo, Hawthorne et al. (1988), ao avaliar as atividades do mentol e do óleo de menta em preparações de tecidos isolados do íleo e do coração, observaram que o relaxamento da musculatura lisa ocorreu em virtude do antagonismo aos canais de  $Ca^{2+}$ . Blanco et al. (2013), ao investigarem os efeitos antiespasmódicos de óleos essenciais de dois quimiotipos sul-americanos de *Lippia alba* M., encontraram evidências de que o mecanismo de ação envolvido no efeito espasmolítico seria possivelmente devido à redução do influxo de  $Ca^{2+}$  ou da ativação de processos contráteis mediados pelo  $Ca^{2+}$ .

A contração do músculo liso pode ser conseguida tanto através de influxo de  $K^+$  que promove depolarização da membrana quanto por aumento na concentração de  $Ca^{2+}$  ou pela ação de agonistas, independente de potencial de membrana.

Agonistas da serotonina, tais como, o carbacol e a histamina ligam-se a receptores acoplados a proteína G (GPCRs) e ativam a cascata do fosfoinositídeos, geralmente mediado por Gq, produzindo trifosfato de inositol (IP3), que estimula a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  a partir do retículo sarcoplasmático. Agonistas contráteis também podem levar ao aumento da liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  através de receptores de rianodina e estimular a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  através de vários tipos de canais, incluindo aqueles ativados por voltagem, por receptor ou por substrato (WATTERSON; RATZ; SPIEGEL, 2005).

Tendo em vista os mecanismos de indução da contração por KCl (alteração do potencial eletroquímico para o íon  $\text{K}^+$  resultando em despolarização da membrana celular e abertura de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  voltagem-dependentes) e do Carbacol (agonista dos receptores muscarínicos subtipo M3) (BOLTON, 1979; WATTERSON; RATZ; SPIEGEL, 2005); bem como a semelhança entre as potências para as contrações tônicas induzidas por KCl e carbacol, sugere-se que o mentofurano atue por envolvimento de uma via em comum, que resulte do bloqueio de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  sensíveis à voltagem e, conseqüentemente, iniba a resposta contrátil aos agentes contraturantes testados. Entretanto, são necessários estudos mais aprofundados para completa elucidação dos mecanismos envolvidos no efeito espasmolítico do mentofurano.

# **Conclusão**

## 6 CONCLUSÃO

A análise dos resultados obtidos indica que o mentofurano apresenta baixo ou nenhum efeito tóxico agudo *in vivo* e que diminui a motilidade gastrointestinal. Esse efeito na motilidade foi evidenciado pelo retardo no esvaziamento gástrico, pela redução do trânsito intestinal normal e pelo efeito espasmolítico em segmentos de íleo isolado. Também foi demonstrado efeito antidiarreico evidenciado pela redução de excreção de fezes moles em modelo de hiperomotilidade intestinal.

A atividade espasmolítica em contrações induzidas por KCl e carbacol pode indicar envolvimento de ativação de canais de potássio e/ou de redução do influxo de cálcio. Estudos adicionais incluindo investigação de toxicidade *in vitro*, e para caracterização dos possíveis mecanismos envolvidos na redução do trânsito gastrointestinal são necessários para avaliar envolvimento dos mecanismos acima citados.

# **Referências**

## REFERÊNCIAS

- AFLATUNI, A. **The yield and essential oil content of mint (*Mentha* sp.) in northern oostrobothnia**. 2005. 50p. Dissertação (Mestrado em biologia) - University of Oulu, Oulu - EUA, 2005.
- AKERELE, O. Summary of WHO guidelines for the assessment of herbal medicines. **HerbalGram**, v. 28, p. 13-19, 1993.
- ALAM, M. S. et al. Efficacy of Peppermint oil in diarrhea predominant IBS-a double blind randomized placebo-controlled study. **Mymensingh medical journal: MMJ**, v. 22, n. 1, p. 27-30, 2013.
- AMERINE, E.; KEIRSEY, M. Managing acute diarrhea. **Nursing**. v. 36, n. 9, p. 1-4, 2006.
- ARAUJO, T. M. E. et al. Surto de diarréia por rotavírus no município de Bom Jesus (PI). **Ciênc. saúde coletiva**, Rio de Janeiro, v. 15, n. 1, p. 1039-1046, 2010.
- ASAO, Takayuki et al. An easy method for the intraluminal administration of peppermint oil before colonoscopy and its effectiveness in reducing colonic spasm. **Gastrointestinal endoscopy**, v. 53, n. 2, p. 172-177, 2001.
- BAIBARS, Motaz et al. Menthol toxicity: an unusual cause of coma. **Case reports in medicine**, v. 2012, 2012.
- BANERJEE, P; SATAPATHY, S.; ANIRUDDHA MUKHOPAHAYAY, A.; DAS, P. Leaf extract mediated green synthesis of silver nanoparticles from widely available Indian plants: synthesis, characterization, antimicrobial property and toxicity analysis. **Bioresources and Bioprocessing**, n. 1, v.3, 2014.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de novos fármacos. **Quim. Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.
- BEHN, H.; ALBERT, A.; MARX, F.; NOGA, G.; ULBRICH, A. Ultraviolet-B and photosynthetically active radiation interactively affect yield and pattern of monoterpenes in leaves of peppermint (*Mentha piperita* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, p.7361-7367, 2010.

BEST, L.; BOLTON, T. B. Depolarisation of guinea-pig visceral smooth muscle causes hydrolysis of inositol phospholipids. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 333, n. 1, p. 78-82, 1986.

BLACK, R.E.; COUSENS, S.; JOHNSON, H.L.; LAWN, J.E.; RUDAN, I.; BASSANI, D.G.; JHA, P.; CAMPBELL, H.; WALKER, C.F; CIBULSKIS, R.; EISELE, T., LIU, L.; MATHERS, C. Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. **Lancet**, v. 375; p. 1969-1987, 2010.

BLANCO, Marcos A. et al. Antispasmodic effects and composition of the essential oils from two South American chemotypes of *Lippia alba*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 149, n. 3, p. 803-809, 2013.

BLISS, D. Z.; DOUGHTY, D.B.; HEITKEMPER, M.M. **Pathology and management of bowel dysfunction**. In: DOUGHTY, D.B. ed. *Urinary & Fecal Incontinence: Current Management Concepts*. 3rd ed. St. Louis: Mosby/Elsevier; p. 425-456, 2006.

BOLTON, T. B. Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle. **Physiological Reviews**, v. 59, n. 3, p. 606-718, 1979.

BORDIGNON, S. A. D. L.; SCHENKEL, E. P.; SPITZER, V. The essential oil composition of *Cunila microcephala* and *Cunila fasciculata*. **Phytochemistry**, v. 44, n. 7, p. 1283-1286, 1997.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman-12**. AMGH Editora, 2012.

BUSTOS-BRITO, Celia et al. Structure, absolute configuration, and antidiarrheal activity of a thymol derivative from *Ageratina cylindrica*. **Journal of natural products**, v. 77, n. 2, p. 358-363, 2014.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, v.55, n.3, São Paulo, Jul/Set, 2003.

CAMILLERI, M.; STANGHELLINI, V. Current management strategies and emerging treatments for functional dyspepsia. **Nature Reviews - Gastroenterology & Hepatology**. v. 10, p. 187–194, 2013.

CAPASSO, F.; RUGGIERO, G.; DI ROSA, M.; SORRENTINO, L. Pharmacological research on a deethylate metabolite of 4-amino- 5-chloro-N-(2-diethylaminoethyl)-2-methoxybenzamide (metoclopramide). **Boll Chim Farmv**. v. 115, p. 649-657, 1976.



CARNEIRO, F. M.; SILVA, M. J. P.; BORGES, L. L.; ALBERNAZ, L. C.; COSTA, J. D. P. Tendências dos estudos com plantas medicinais no Brasil. **Revista Sapiência: sociedade, saberes e práticas educacionais** – UEG/Câmpus de Iporá, v.3, n. 2, p.44-75 – jul/dez 2014.

CHACÍN-BONILLA, L. Cryptosporidiasis in humans. Review. **Invest Clin**; v. 36, p. 207-50, 1995.

CHANG, T.H.; HSIEH, .FL.; KO, T.P.; TENG, K.H.; LIANG, P.H.; WANG, A.H. Structure of a Heterotetrameric Geranyl Pyrophosphate Synthase from Mint (*Mentha piperita*) Reveals Intersubunit Regulation. **Plant Cell**, v. 22, n. 2, p. 454–467, 2010.

CHEN, Y.T. et al. Ghrelin improves LPS-induced gastrointestinal motility disturbances: roles of NO and prostaglandin E2. **Shock**, v. 33, p. 205–212, 2010.

CHENG, C.W.; BIAN, Z.X.; WU, T.X. Systematic review of Chinese herbal medicine for functional constipation. **World Journal of Gastroenterology**, v.15, p. 4886–4895, 2009.

CLARK, R. J.; MENARY, R. C. Environmental effects on Peppermint (*Mentha piperia* L.) I. Effects of daylength, photon flux density, night temperatura and day temperatura on the yield and composition of peppermint oil. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 7, p. 685–692, 1980.

COSTA, A. G. Crescimento vegetativo e produção de óleo essencial de hortelã-pimenta cultivada sob malhas. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Brasília, v. 47, n. 4, p. 534-540, 2012.

COSTA, D. A; OLIVEIRA, G. A. L.; COSTA, J. P.; SOUZA, G. F.; SOUSA, D. P; FREITAS, R. M. Avaliação da Toxicidade Aguda e do Efeito Ansiolítico de um Derivado Sintético da Carvona. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v.16, n.3, p. 303-310, 2012.

CUNHA, A. P.; TEIXEIRA, F.; SILVA, A.; ROQUE, O. **Plantas na terapêutica, farmacologia e ensaios clínicos**. 2 ed. Lisboa: Portugal: Fundação Calouste Gulbenkian. 2010. 476 p.

DERWICH, E.; BENZIANE, Z.; BOUKIR, A. GC/MS analysis and antibacterial activity of the essential oil *Mentha pulegium* grown in Morocco. **Research Journal of Agriculture and Biological**. v. 6, p.191–198, 2010.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products biosynthetic approach**. 2 ed. British Library, Chichester: Wiley, 2009. 515 p.

FAFARD, J.; LALONDE, R. Long-standing symptomatic cryptosporidiosis in a normal man: clinical response to spiramycin. **Journal of Clinical Gastroenterology**; v. 12, p. 190-201, 1990.

FARTHING, M. J. Diarrhoea: a significant worldwide problem. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 14, p. 65–69, 2000.

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

FIRMAN, C. M. G; COSTA, M. M. B.; COSTA, M. L.; LEMME, E. Avaliação qualitativa e quantitativa do esvaziamento gástrico através do método videofluoroscópico. **Arq. Gastroenterol.**, v.37, n.2, 2000.

FURNESS, J. B.; COSTA, M. Gallamin immunoreactive neurons in the - guinea pig small intestine : the projections and relationship to other enteric neurons. **Tissue Res.**, v. 250, p.607- 615, 1987.

GRISI, M. C. C. Avaliação de Genótipos de Menta (*Mentha* spp) nas condições do Distrito Federal, **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Botucatu, v. 8, n. 4, p. 33-39, 2006.

GOERG, K. J.; SPILKER, T. H. Effect of peppermint oil and caraway oil on gastrointestinal motility in healthy volunteers: a pharmacodynamic study using simultaneous determination of gastric and gall-bladder emptying and oro-caecal transit time. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 17, n. 3, p. 445-451, 2003.

GUERRANT, R.L. et al . Practice Guidelines for the Management of Infectious Diarrhea. **Medicine & Health - Clinical infectious Diseases**, v.2, n. 3 p. 331-351, 2001.

HALL, V. Acute uncomplicated diarrhea management. **Practice Nursing**, v. 21, n. 3, p. 118-122, 2010.

HASLER, W. L. **The physiology of gastric motility and gastric emptying**. In: YAMADA, T.; ALPERS, D. H.; OWYANG, C. Textbook of Gastroenterology. 2.ed. Philadelphia, Lippicott, 1995. p.181-206.

HAWTHORN, M. et al. The actions of peppermint oil and menthol on calcium channel dependent processes in intestinal, neuronal and cardiac preparations. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 2, n. 2, p. 101-118, 1988.

HIKI, Naki et al. Peppermint oil reduces gastric spasm during upper endoscopy: a randomized, double-blind, double-dummy controlled trial. **Gastrointestinal endoscopy**, v. 57, n. 4, p. 475-482, 2003.

HILLS, J. M.; AARONSON, P. I. The mechanism of action of peppermint oil on gastrointestinal smooth muscle: an analysis using patch clamp electrophysiology and isolated tissue pharmacology in rabbit and guinea pig. **Gastroenterology**, v. 101, n. 1, p. 55-65, 1991.

KHALIL, A. F.; ELKATRY, H. O.; EL MEHAIRY, H. F. Protective effect of peppermint and parsley leaves oils against hepatotoxicity on experimental rats. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 60, n. 2, p. 353-359, 2015.

KATELARIS, P. H.; FARTHING, M. J. Diarrhoea and malabsorption in giardiasis: a multifactorial process. **Gut**; v. 33, p. 295-7, 1992.

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

LAMBERTI, L. M.; FISCHER, C.L.; NOIMAN, A.; VICTORA, C., BLACK RE: Breastfeeding and the risk for diarrhea morbidity and mortality. **BMC Public Health**. v. 11, n. 3, p. S15-S17, 2011.

LEITE, W. S.; SILVA, A. S.; NUNES, C. S.; RODRIGUES, J. A. S., MARDEN R. B. P.; RAMILER, A. S.; SANTOS, P. H. N. **Estudo comparativo do efeito antidiarreico da loperamida, escopolamina e Hiosciamina em diarreias induzidas por óleo de rícino na espécie Mus musculus**. In: Anais eletrônicos revista meio-norte de medicina laboratorial. Med lab, n. 1, 2014. Teresina-PI, 2014

LINHARES, Alexandre C.. Epidemiologia das infecções por rotavírus no Brasil e os desafios para o seu controle. **Cad. Saúde Pública**, v. 16, n. 3, p. 629-646, 2000.

LOUREIRO, S. **Guia de remédios naturais para crianças**. 1. ed. Portugal: Nascente. 2012. 432 p.

LUTTERODT, G. D. Inhibition of gastrointestinal release of acetylcholine by quercetin as a possible mode of action of *Psidium guajara* leaf extracts in the treatment of acute diarrhoea disease. **J Ethnopharmacology**, v. 23, p. 235-47, 1989.

MACHADO, B. F. M. T.; FERNANDES JÚNIOR, A. Óleos Essenciais: Aspectos gerais e usos em terapias naturais. **Cadernos Academicos**. v. 3, n. 2, p. 105-127, 2011.

MAHMOUD, S. S.; CROTEAU, R. B. Menthofuran regulates essential oil biosynthesis in peppermint by controlling a downstream monoterpene reductase. **PNAS**. v. 25, p. 100-24, 2003.

MALMUDS, L. S; VITTI, R. A. Gastric emptying. **Journal of Nuclear Medicine**. v. 31, p. 1499-500, 1990.

MANZIONE, C. R.; NADAL, S.R; CALORE, E.E; MANZIONE, T.S. Achados Colonoscópicos e Histológicos em Doentes HIV+ com Diarréia Crônica. **Revista brasileira Coloproctologia**, v. 23, n. 4, p. 256-261, 2003.

MATHAN, V. I. Diarrhoeal diseases. **British Medical Bulletin**, v. 54, p. 402–419. 1998.

MATTEI, P.; ROMBEAU, J.L. Review of the pathophysiology and management of postoperative ileus. **World Journal of Surgery**;v.30, n. 8, p. 1382–91, 2006.

MESQUITA, D. K. M. Manejo e tratamento da diarreia em crianças. **UNA-SUS/UFMA**. 2014. Disponível em: <<https://ares.unasus.gov.br/acervo/handle/ARES/1617>>. Acesso em 23 fevereiro 2016.

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

MOTTA, M. E. F. A.; SILVA, G. A. Pontes da Diarréia por parasitas. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**. v. 2, n. 2, p. 117-127, 2002.

MOURÃO, A. O.; DAMIÃO, C.; SIPAHI, A. M. Síndrome do intestino irritável. **RBM** v. 59, n. 12. Disponível em: <[http://www.moreirajr.com.br/revistas.asp?id\\_materia=2178&fase=imprime](http://www.moreirajr.com.br/revistas.asp?id_materia=2178&fase=imprime)>. Acesso em: 9 maio 2016.

NAHRSTEDT, A. The significance of secondary metabolites for interaction between plants and insects. **Planta Medica**, v. 55, p. 333-33, 1989.

NEGI, J. S. et al. Antidiarrheal activity of methanol extract and major essential oil contents of *Saussurea lappa* Clarke. **African journal of pharmacy and pharmacology**, v. 7, n. 8, p. 474-477, 2013.

NIGATU, B. **Antispasmodic, antidiarrheal and LD50 determination of *Syzygium guineense* in animal models**. 2004. Tese de Doutorado. Master's thesis submitted to the school of graduate studies, Addis Ababa, Ethiopia.

NILO, M. C. S. S., **Composição química e atividade antioxidante da hortelã pimenta (*Mentha piperita*)** 2015. 65p. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

RACHMILEWITZ, D. Prostaglandins and diarrhea. **Digestive diseases and sciences**, v. 25, n. 12, p. 897-899, 1980.

OECD. Organization for Economic Cooperation and Development. Guideline 420: Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure. OECD Guidelines for the testing of chemicals, vol. 2. **Head of Publications Service**. Paris, France. 2001. Disponível em: <<http://www.oecd.org/publications>>.

ROZZA, A. L. et al. Effect of menthol in experimentally induced ulcers: pathways of gastroprotection. **Chemico-biological interactions**, v. 206, n. 2, p. 272-278, 2013.

SALES, I. R. P. **Cissampelos sympodialis EICHL.(*Menispermaceae*): avaliação das atividades antimotilidade e antidiarreica in vivo**. 2014. 55f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Farmácia). – Universidade Federal da Paraíba. Paraíba, 2014.

SANTOSHAM, M.; CHANDRAN, A.; FITZWATER, S; FISCHER-WALKER, C; BAQUI, A. H., BLACK, R. Progress and barriers for the control of diarrhoeal disease. **Lancet** v. 376; p. 63-67, 2010.

SCHILLER, L.R. Diarrhea and malabsorption in the elderly. **Gastroenterology Clinics of North America** v. 38, n. 3, p. 481-502, 2009.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis. . 2004, 424p.

SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Ca<sup>2+</sup> sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. **Physiological Reviews**, v.83, p. 1325-1358, 2003.

SPILLER, R. C.; THOMPSON, W. G. Transtornos intestinais. **Arquivos de gastroenterologia**. v. 49, n. supl, 2012.

STRASINGER, S.; DI LORENZO, M. **Fecal analysis**. In *Urinalysis & Body Fluids* (5 ed.) Philadelphia, Pennsylvania: F.A. Davis. p. 245-257. 2008.

THOMASSEN, David et al. Reactive intermediates in the oxidation of menthofuran by cytochromes P-450. **Chemical research in toxicology**, v. 5, n. 1, p. 123-130, 1992.

UNICEF - The United Nations Children's Fund. Countdown to 2015: maternal, newborn and child survival. **Tracking progress in maternal, neonatal and child survival: the 2008 report**. New York, NY: UNICEF, 2008.

WATTERSON, K.R.; RATZ, P.H.; SPIEGEL, S The role of sphingosine-1-phosphate in smooth muscle contraction. **Cell Signal**, v.17, p. 289-298, 2005.

WEBB, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Advances in Physiology Education**, v.27, p.397-407, 2005.

JOINT UNITED NATIONS PROGRAMME ON HIV/AIDS.; UNICEF.; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Children and AIDS: Second stocktaking report**. UNICEF, 2008.

YIN, X.; GU, X.; YIN, T.; WEN, H.; GAO, X.; ZHENG, X. Study of enteropathogenic bacteria in children with acute diarrhoea aged from 7 to 10 years in Xuzhou, China. **Microbial pathogenesis**, v. 91, p. 41-45, 2016.

ZU, Y.; YU, H.; LIANG, L.; FU, Y.; EFFERTH, T.; LIU, X.; WU, N. Activities of ten essential oils toward *Propionibacterium acnes* and PC-3 A-549 and MCF-7 cancer cells. **Molecules**, v. 15, p. 3200–3210, 2010.