



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

KATHARINA RODRIGUES DE LIMA PORTO RAMOS

**Avaliação da atividade antidiarreica de *Spondias purpurea* L. (Anacardiaceae)
em modelos animais**

CAMPINA GRANDE – PB

2013

KATHARINA RODRIGUES DE LIMA PORTO RAMOS

**Avaliação da atividade antidiarreica de *Spondias purpurea* L.
(Anacardiaceae) em modelos animais**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

CAMPINA GRANDE - PB

2013

KATHARINA RODRIGUES DE LIMA PORTO RAMOS

**Avaliação da atividade antidiarreica de *Spondias purpurea* L.
(Anacardiaceae) em modelos animais**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento à exigência para obtenção do grau de mestre em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADORA: Prof^a Dr^a Mônica Oliveira da Silva Simões

CO-ORIENTADORA: Prof^a Dr^a Vanda Lúcia dos Santos

CAMPINA GRANDE – PB

2013

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

R175a Ramos, Katharina Rodrigues de Lima Porto.
Avaliação da atividade antidiarreica de *Spondias purpurea* L. (Anacardiaceae) em modelos animais [manuscrito] / Katharina Rodrigues de Lima Porto Ramos. - 2013.
96 p. : il. color.

Digitado.
Dissertação (Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2013.
"Orientação: Profa. Dra. Mônica Oliveira da Silva Simões, Departamento de Farmácia".
"Co-Orientação: Profa. Dra. Vanda Lúcia dos Santos, Departamento de Farmácia".
1. Diarréia. 2. *Spondias purpurea* L. 3. Etnofarmacologia. 4. PCR-ultrasensível. I. Título.

21. ed. CDD 618.92

KATHARINA RODRIGUES DE LIMA PORTO RAMOS

**Avaliação da atividade antidiarreica de *Spondias purpurea* L.
(Anacardiaceae) em modelos animais**

APROVADA EM: 04/09/2013

BANCA EXAMINADORA:



Profa. Dra. Mônica Oliveira da Silva Simões
Orientadora – UEPB



Profa. Dra. Vanda Lucia dos Santos
Co-orientadora – UEPB



Profa. Dra. Ana Cláudia Dantas Medeiros
Examinadora Interna – UEPB



Profa. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva
Examinadora Externa – UFPE

CAMPINA GRANDE - PB

2013

*“O saber a gente aprende com os mestres e os livros.
A sabedoria se aprende é com a vida e com os humildes.”*

(Cora Coralina)

*Tudo é do PAI!
Toda honra e toda glória.
É dele à vitória alcançada em minha vida...*

(Pe. Fábio de Melo)

A minha filha Maria Beatriz, a maior razão de lutar por meus objetivos, luz em minha vida:

A meu esposo, amigo e companheiro Felipe, por toda dedicação, companheirismo e incentivo nos momentos mais difíceis:

A minha querida e amada mãe Piedade, exemplo de garra e força, minha fortaleza:

Ao meu pai Ranulfo e aos irmãos Karola e Ranulfinho por todo apoio, amor e amizade dedicados a mim.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pelo dom da vida e por ser luz, inspiração e por bênçãos derramadas em minha vida a cada nascer do sol;

A minha filha Maria Beatriz e a meu esposo Felipe, pela compreensão e amor;

A meus pais, Ranulfo e Piedade por todos os ensinamentos, esforços e incentivo dedicados a mim, na busca de novos conhecimentos;

Aos meus irmãos Karola e Ranulfinho, por todo incentivo, por acreditarem em mim;

A minha prima irmã Narciza, por toda ajuda e admiração em todos os momentos;

Aos meus queridos Dora, Amaurí e Janaína pela ajuda no dia-a-dia;

A amiga Vanessa, por toda ajuda, disponibilidade e dedicação;

A minha querida amiga e companheira dessa jornada, de tantas lágrimas e momentos difíceis Cynthia Layse por toda amizade e dedicação, sem você tudo seria muito mais difícil;

A minha orientadora Prof^ª Dr^ª Mônica Oliveira da Silva Simões, por ter mim aceitado como orientanda, disponibilidade e pelos ensinamentos nessa jornada;

A minha co-orientadora Prof^ª Dr^ª Vanda Lúcia dos Santos, por toda a dedicação e ajuda;

A minha amiga de trabalho e de turma Michelle Pedrosa, pelo incentivo e ajuda na seleção desse mestrado;

Aos todos os meus colegas de trabalho do Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Estadual da Paraíba (LAC-UEPB), pela compreensão e incentivo e colaboração, especialmente a Prof^ª Dr^ª Zilka, Prof^ª Dr^ª Maria Auxiliadora, Niedja, George, Pierre, Camila e Juliana;

Aos colegas da turma pioneira do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UEPB, especialmente Giovanna, Danielle, Jamille, Gabriela e Ravelly, pela amizade e companheirismo;

A FURNE, Fundação Universitária de Apoio ao ensino, Pesquisa e Extensão, pela permissão para a coleta das folhas de siriguela no orto;

A FACISA, Faculdade de Ciências Sociais Aplicadas, por ceder o biotério para a realização dos experimentos;

Aos funcionários do biotério da FACISA, especialmente, a veterinária Thárcia Kiara e a técnica de laboratório Érica por toda amizade e ajuda;

Aos alunos de iniciação científica Jéssica, Maciel, Helimarcos e Jonatha Alexandre por toda ajuda e dedicação durante os experimentos;

A professora Raissa Mayer Catão pela permissão para a utilização do laboratório de Atividade Antimicrobiana;

Aos amigos Paulo César, Felipe Hugo, Thiago Pereira, Wilma Rayane e Igor Rafael a paciência e a ajuda de vocês foi essencial;

Ao LABDEM, na pessoa da Profª Drª Ana Cláudia Dantas de Medeiros, pela ajuda e permissão na utilização do laboratório;

Aos professores Karina Saraiva, Walclécio Lira, Jaime Mendonça e equipe, pela constante força e colaborações;

Ao Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste-CETENE/INT-Nordeste, pela realização das análises histológicas;

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UEPB, pelos ensinamentos e dedicação na formação de novos mestres;

À Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) em especial ao Departamento de Farmácia, pelo incentivo e investimento na qualificação e aperfeiçoamento dos seus funcionários, proporcionando minha liberação para a capacitação;

A CAPES pelo apoio financeiro e pelo suporte técnico-científico através do Portal Periódico;

A todos que direta ou indiretamente participaram da produção deste trabalho;

O meu muitíssimo obrigada!

Katharina Rodrigue de Lima Porto Ramos

RESUMO

Avaliação da atividade antidiarreica de *Spondias purpurea* L. (Anacardiaceae). RAMOS, K. R. L. P. (2013). Dissertação de Mestrado, CCBS/UEPB.

A diarreia está associada à frequência excessiva de defecação, provocada pelo aumento da motilidade e secreção. *Spondias purpurea* L. pertence ao gênero *Spondias*, utilizado pela população como gastroprotetora, antidiarreica e antimicrobiana. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antidiarreica do extrato etanólico bruto e da fase diclorometano de *S. purpurea* L., em modelos animais. Foram obtidos o extrato etanólico (EEtOH-Sp) e a fase diclorometano (FaDCM-Sp) das folhas de *S. purpurea*. Na determinação fitoquímica foi observado que o EEtOH-Sp apresentou aproximadamente 6.70% de flavonóides totais, e 3,17% de polifenóis. Na avaliação toxicológica, pelo método da *Artemia salina* Leach, as amostras apresentaram valores de Concentração Letal 50% (CL₅₀) de 2300,67±196,66 µg/mL para o EEtOH-Sp e 1106,17±102,24 µg/mL para a FaDCM-Sp, indicando não apresentarem toxicidade. No Ensaio Toxicológico Pré-clínico Agudo, foi administrada 2000 mg/kg do EEtOH-Sp e foi observada apenas irritabilidade revertida nas fêmeas após a 2^a hora, sendo este um dado insuficiente para inferir toxicidade, também não provocou variações no peso nem na estrutura macroscópica dos órgãos, no consumo de água, ração e nos parâmetros bioquímicos e hematológicos. Não foi possível determinar a DL₅₀, visto que não houve mortes, ao final dos 14 dias de observação. Com relação à atividade antimicrobiana pela técnica de microdiluição, não foi observada atividade de EEtOH-Sp e FaDCM-Sp nas concentrações testadas frente aos microorganismos testados. Na determinação da motilidade gastrointestinal, através do modelo de diarreia induzida por óleo de rícino em ratos, a inibição foi de 33, 54 e 63% para EEtOH-Sp e 63, 68 e 85% para FaDCM-Sp, ambos nas doses de 125, 250 e 500 mg/kg (v.o.). Foi observada uma diminuição do número de fezes líquidas em 41, 67 e 25% para EEtOH-Sp e 48, 68 e 65% para FaDCM-Sp. Em relação ao número total de fezes tanto o EEtOH-Sp quanto a FaDCM-Sp apresentaram comportamento semelhante. A PCR-ultrasensível foi quantificada e reduziu os níveis de inflamação aguda. Houve um aumento nas concentrações dos ionogramas. O estudo histopatológico confirmou que FaDCM-Sp minimizou o dano histológico no íleo. No modelo para avaliar alterações no esvaziamento gástrico e na motilidade intestinal, os valores do EEtOH-Sp e FaDCM-Sp não apresentaram significância estatística. Estes resultados mostram que *S. purpurea* pode ser um possível antidiarreico, como indicado pela medicina tradicional, que não causa constipação, não atinge a flora bacteriana intestinal e com atividade anti-inflamatória.

Palavras-chave: *Spondias purpurea*, diarreia, antimicrobiano, etnofarmacologia, PCR-ultrasensível.

ABSTRACT

Evaluation of anti-diarrheal activity of *Spondias purpurea* L. (Anacardiaceae). RAMOS, K. R. L. P. (2013). Master's thesis, CCBS/UEPB.

Diarrhea is often associated with excessive defecation caused by increased motility and secretion. *Spondias purpurea* L. belongs to the genus *Spondias*, used by the population as gastroprotective, antidiarrheal and antimicrobial. The objective of this work was to evaluate the antidiarrheal activity of crude ethanol extract and dichloromethane phase of *S. purpurea* L., in animal models. Were obtained from the ethanol extract (Sp-EtOHE) and phase dichloromethane (Sp-DCPM) of the leaves of *S. purpurea*. In determining phytochemical noted that Sp-EtOHE was approximately 6.70% of total flavonoids, polyphenols and 3.17%. Toxicological evaluation by the method of *Artemia salina* Leach, the samples showed values of 50% lethal concentration (LC50) of 2300.67 ± 196.66 mg / mL for Sp-EtOHE and 1106.17 ± 102.24 mg / mL for Sp-DCPM, indicating not present toxicity. In Test Toxicology Preclinical acute was administered 2000 mg / kg Sp-EtOHE was observed only irritability reversed in females after the 2nd hour, this being a given insufficient for inferring toxicity, also did not cause variations in the height or in the macroscopic structure bodies, water consumption, diet and biochemical and hematological parameters. Unable to determine the LD50, as there were no deaths at the end of the 14 days of observation. With respect to antimicrobial activity by microdilution, there was no activity Sp-EtOHE and Sp-DCPM concentrations tested against the tested microorganisms. In determining the gastrointestinal motility through the model of induced diarrhea in rats castor oil, the inhibition was 33, 54 and 63% Sp-EtOHE and 63, 68 and 85% for Sp-DCPM, both at doses of 125 , 250 and 500 mg/kg (po). It was observed a decrease in the number of liquid stools at 41, 67 and 25% for Sp-EtOHE and 48, 68 and 65 for Sp-DCPM. In relation to the total number of feces both Sp-EtOHE and Sp-DCPM as presented similar behavior. The CRP-ultrasensitive was quantified and reduced levels of acute inflammation. There was an increase in the concentrations of ionograms. The study confirmed that Sp-DCPM minimized the histological damage in the ileum. The model to assess changes in gastric emptying and intestinal motility values Sp-EtOHE and Sp-DCPM not statistically significant . These results show that *S. purpurea* may be possible antidiarrheal as indicated by the traditional medicine that does not cause constipation not reach the intestinal bacterial flora and anti-inflammatory activity.

Key words: *Spondias purpurea*, diarrhea, antimicrobial, ethnopharmacology, CRP-ultrasensível.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema das Vilosidades e Microvilosidades intestinais	20
Figura 2 - Regulação dos processos de absorção e secreção no intestino	22
Figura 3 - Esquema da diarreia secretória (↑Secreção ativa de íons e ↓absorção de água)	25
Figura 4 - Árvore adulta de <i>Spondias purpurea</i> L. (A) e em detalhes folhas (B).....	33
Figura 5 - Coleta de folhas de <i>Spondias purpurea</i> : árvore (A), folhas coletadas (B) e folhas secas (C)	40
Figura 6 - Marcha fitoquímica para obtenção do Extrato Etanólico Bruto (EEtOH-Sp) e da Fase Diclorometano (FaDCM-Sp) das folhas de <i>Spondias purpurea</i>	41
Figura 7 - Rato Wistar (<i>Rattus norvegicus</i>).....	44
Figura 8 - Efeito da administração oral do EEtOH-Sp e da Loperamida na diarreia induzida por óleo de rícino em ratos.....	58
Figura 9 - Efeito da administração oral do FaDCM-Sp e da Loperamida na diarreia induzida por óleo de rícino em ratos.....	59
Figura 10 - Cortes histológicos do íleo de Ratos Wistar submetidos à diarreia induzida por óleo de Rícino. (A-B) Grupo Controle negativo – Salina 0,9% e (C-D) Grupo Controle positivo – Loperamida.....	63
Figura 11 - Cortes histológicos do íleo de Ratos Wistar submetidos à diarreia induzida por óleo de Rícino. (E-F) Grupo pré-tratado com FaDCM-Sp 125 mg, (G-H) Grupo pré-tratado com FaDCM-Sp 250 mg, (I-J) Grupo	64
Figura 12 - Efeito da administração oral do EEtOH-Sp e metoclopramida no trânsito intestinal de ratos	66
Figura 13 - Efeito da administração oral do FaDCM-Sp e metoclopramida no trânsito intestinal de ratos	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Opções terapêuticas para a diarreia	29
Tabela 2 - Quantificação de polifenóis e flavonóides totais no EEtOH-Sp	53
Tabela 3 - Valores da Concentração Letal 50% do EEtOH-Sp e da FaDCM-Sp frente a <i>Artemia salina</i>	53
Tabela 4 - Efeito da administração oral do EEtOH-Sp obtido das folhas de <i>Spondias purpurea</i> no consumo de ração e água, evolução ponderal e peso dos órgãos por ratos Wistar machos e fêmeas, durante 14 dias.....	55
Tabela 5 - Efeito da administração oral do EEtOH-Sp obtido das folhas de <i>Spondias purpurea</i> nos parâmetros hematológicos de ratos Wistar machos e fêmeas, durante 14 dias	56
Tabela 6 - Efeito da administração oral do EEtOH-Sp obtido das folhas de <i>Spondias purpurea</i> nos parâmetros bioquímicos de ratos Wistar machos e fêmeas, durante 14 dias.....	57
Tabela 7 - Efeito da administração oral do EEtOH-Sp, da FaDCM-Sp e Loperamida na diarreia induzida por óleo de rícino em ratos	60
Tabela 8 - Perfil do PCR-ultrassensível em modelo de diarreia induzida por óleo de Rícino em ratos tratados oralmente com salina 0,9%, EEtOH-Sp, FaDCM-Sp e Loperamida	61
Tabela 9 - Perfil do Ionograma em modelo de diarreia induzida por óleo de rícino em ratos tratados oralmente com salina 0,9%, EEtOH-Sp, FaDCM-Sp e Loperamida	62
Tabela 10 - Efeito da administração oral do EEtOH-Sp e FaDCM-Sp no esvaziamento gástrico em ratos	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINES – Anti-inflamatório não esteroidal
ALT – Alanina Aminotransferase
AMPc – Monofosfato cíclico de Adenosina
AST – Aspartato Aminotransferase
CESED – Centro de Ensino Superior e Desenvolvimento
CETENE – Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste
CEUA – Comissão de Ética em Uso Animal
CFTR – Condutância Transmembrana do canal de Cl⁻ na Fibrose Cística
CFVM – Conselho Federal de Medicina Veterinária
CHCM – Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média
CK-nac – Creatina Quinase
Cl⁻ – Íon cloro
COX – ciclo-oxigenase
DL₅₀ – Dose Letal 50%
EEtOH-Sp – Extrato Etanólico Bruto de *Spondias purpurea*
FA – Fosfatase Alcalina
FaDCM-Sp – Fase Diclorometano de *Spondias purpurea*
FURNE – Fundação Universitária de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão
GC-C – Guanilato-ciclase C
GGT – Gama GT
GMPc – Monofosfato cíclico de Guanosina
H⁺ – Íon hidrogênio
HCO₃⁻ – Íon bicarbonato
HDL – Lipoproteína de Alta Densidade
IL-6 – Interleucina
K⁺ – Íon potássio
LABDEM – laboratório de Desenvolvimento de Medicamentos
Na⁺ – Íon sódio
OMS – Organização Mundial de Saúde
PCR-ultrassensível – Proteína C Reativa ultrassensível
PGs – Prostaglandinas

PKA – Proteína quinase A

SNA – Sistema Nervoso Autônomo

SNC – Sistema Nervoso Central

TRO – Terapia de Reidratação Oral

UEPB – Universidade Estadual da Paraíba

UNICEF – Fundo das Nações Unidas para a Infância

VFC – Vermelho de Fenol 0,05% em Carboximetilcelulose 1,5%

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1 Fisiologia do Intestino Delgado	20
2.2 Diarreia	23
2.2.1 Terapêutica da Diarreia	27
2.2.2 Óleo de Rícino	30
2.3 Plantas do Semiárido	31
2.3.1 Espécie Vegetal Selecionada para Estudo	32
2.3.2 <i>Spondias purpurea</i> L.	33
3. OBJETIVOS	36
3.1 Objetivo Geral	36
3.1.3.1 Determinação de polifenóis totais	42
3.2 Objetivos Específicos	36
4. METODOLOGIA	39
4.1 MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1.1 Local da Pesquisa	39
4.1.2 Obtenção do Extrato Etanólico Bruto e Fases	39
4.1.2.1 Material Botânico	39
4.1.2.2 Preparação do Extrato Etanólico Bruto e Fases	40
4.1.3 Determinação fitoquímica de polifenóis e flavonoides totais	42
4.1.3.2 Determinação de Flavonoides totais	42
4.1.4 Ensaios Toxicológicos de <i>Spondias purpurea</i> L.	43
4.1.4.1 Determinação da Concentração Letal 50% (CL50)	43
4.1.4.2 Ensaio Toxicológico Pré-clínico Agudo e Determinação da DL50	44
4.1.5 Avaliação da Atividade Antimicrobiana	46
4.1.5.1 Micro-organismos	46
4.1.5.2 Meios de Cultura	46
4.1.5.3 Preparação do Inócuo	46
4.1.5.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	47
4.1.6 Comitê de Ética	51
4.1.6 Determinação da Motilidade Gastrintestinal	48
4.1.6.1 Amostras utilizadas na motilidade gastrintestinal	48

4.1.6.2	Diarreia Induzida por Óleo de Rícino.....	48
4.1.6.3	Histologia do Íleo na Diarreia Induzida por Óleo de Rícino.....	49
4.1.6.4	Esvaziamento Gástrico.....	49
4.1.6.5	Trânsito Intestinal.....	50
4.1.7	Análise Estatística.....	51
5.	RESULTADOS.....	53
5.1	Determinação fitoquímica de polifenóis e flavonóides totais.....	53
5.2	Ensaio Toxicológicos de <i>Spondias purpurea</i> L.	53
5.2.1	Determinação da Concentração Letal 50% (CL50%) frente à <i>Artemia salina</i>	53
5.2.2	Ensaio Toxicológico Pré-clínico Agudo	54
5.3	Avaliação da Atividade Antimicrobiana.....	57
5.4	Determinação da Motilidade Gastrintestinal.....	58
5.4.1	Diarreia Induzida por Óleo de Rícino.....	58
5.4.2	Histologia do Íleo na Diarreia Induzida por Óleo de Rícino.....	62
5.4.3	Esvaziamento Gástrico.....	65
5.4.4	Trânsito Intestinal.....	65
6.	DISCUSSÃO	69
7.	CONCLUSÃO.....	78
	ANEXOS.....	93
	PERSPECTIVAS FUTURAS	81
	REFERÊNCIAS	83
	ANEXOS	93



Introdução

1. INTRODUÇÃO

A origem do conhecimento do homem sobre as propriedades medicinais das plantas confunde-se com sua própria história. Há milênios as plantas têm sido utilizadas pelos seres humanos no tratamento de doenças. Porém, apenas recentemente tornaram-se objeto de estudos científicos em relação às suas variadas propriedades medicinais. Informações sobre os conhecimentos tradicionais ou grupos étnicos de plantas medicinais e seus usos representam um papel vital na descoberta de novos produtos como agentes quimioterapêuticos (AGRA et al, 2008; GUTIERREZ et al, 2007).

Segundo Gurib-Fakim (2006), o emprego de plantas medicinais como medicamento tem uma grande importância na terapêutica mundial, uma vez que de acordo com dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), 80 % da população mundial faz uso de plantas medicinais no tratamento de suas afecções sendo a maioria, de países em desenvolvimento (GACHET et al, 2010).

As grandes fontes de biodiversidade são as florestas tropicais, localizadas em países em desenvolvimento como o Brasil, sendo este, o detentor da maior floresta equatorial e tropical úmida do planeta e de um terço da flora mundial. No entanto, possui um conhecimento científico relativamente baixo das plantas destinadas ao uso medicinal (KLEIN, 2009).

O consumo de produtos de origem vegetal tem aumentado a cada dia e este consumo pode estar associado ao fato de que as populações questionam os perigos do uso irracional dos medicamentos alopáticos associados a seus custos muitas vezes dispendiosos e procuram substituí-los pelo uso de plantas medicinais (KLEIN, 2009). Tendo em vista o amplo consumo de produtos de origem vegetal no Brasil e o crescente desenvolvimento de fitoterápicos como medicamentos em nível industrial, a aplicação de normas sobre a sua elaboração faz-se importante (CARVALHO, 2008).

Nos últimos dez anos, a legislação brasileira para medicamentos fitoterápicos evoluiu muito em vários aspectos, aproximando-se das diretrizes internacionais podendo ser citada várias regras que demonstrem claramente esse avanço. Houve uma melhora no controle de matérias-primas e medicamentos fitoterápicos, criando-se leis para uniformizar os estudos de estabilidade, orientando na validação de

métodos analíticos e bioanalíticos, e para realizar estudos pré-clínicos de toxicidade (BRASIL. ANVISA, 2004 e 2010; BUFAINO, 2013).

A partir de 2006, com o objetivo de promover o desenvolvimento socioeconômico e sustentável da biodiversidade na área de plantas medicinais e fitoterápicos e proporcionar melhorias na qualidade de vida da população brasileira, foi instituída, a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, por meio do Decreto nº 5.813 (BRASIL, 2006). No Brasil, diretrizes do Ministério da Saúde determinaram prioridades na investigação das plantas medicinais, implantando a fitoterapia como prática oficial da medicina, orientando sua inclusão no SUS (VEIGA JUNIOR, 2008).

Para tanto, a partir daí, surge à necessidade do estudo mais detalhado da composição química das plantas medicinais de interesse. Segundo Silva et al. (2010), quando não se dispõe de estudos químicos sobre a espécie de interesse, a análise fitoquímica pode identificar os grupos de metabólitos secundários relevantes, para que assim possa chegar ao isolamento de princípios ativos importantes na produção de novos fitoterápicos.

De acordo com Braz-Filho (2010), as atividades da fitoquímica podem contribuir significativamente para a concretização dessa Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, através da investigação da flora e seu quimismo, da divulgação e geração de novos conhecimentos e da formação de recursos humanos qualificados.

O exercício da fitoterapia representa uma prática sociocultural da comunidade, que vem sendo aceita e utilizada por médicos do mundo todo, ainda que estes tenham sido formados em instituições pertencentes a um modelo biomédico-farmacológico de atenção à saúde (SILVEIRA, 2008).

Na verdade, há poucos dados na literatura sobre a eficácia, segurança e qualidade de muitas plantas medicinais e a sua larga utilização não é suficiente para validá-las eticamente como medicamentos seguros e eficazes. De acordo com as indicações etnofarmacológicas as atividades biológicas das plantas envolvem atividades anti-inflamatória, antimicrobiana, antiulcerogênica e antidiarreica entre outras (SOUZA, 2011).

As questões epidemiológicas e experimentais relacionadas a doenças diarreicas são relatadas em todo o mundo. Muitos fármacos sintéticos disponíveis atualmente podem curar a diarreia, outras produzem efeitos colaterais relacionados ao trato gastrointestinal como constipação ou diarreia. Devido à crescente conscientização sobre os efeitos colaterais dos medicamentos sintéticos, o uso dos de origem vegetal tem vindo a ganhar importância, tanto nos países orientais como nos ocidentais (ARIF et al, 2008).

Vários estudos têm mostrado que a administração prévia de alguns extratos de plantas tem um efeito protetor sobre o trato gastrintestinal, a exemplo das pesquisas de Khazaei e Salehi, (2006), Lemos et al, (2011) e Taha et al, (2012) que comprovaram o efeito gastroprotetor dos extratos de *Falcaria vulgaris*, de *Brassica oleracea* e *Turnera diffusa* Willd respectivamente. A atividade antidiarreica de *Oroxylum indicum* e *Teucrium Polium* foi demonstrada por Joshi et al (2012) e Allahtavakoli et al (2013), respectivamente.

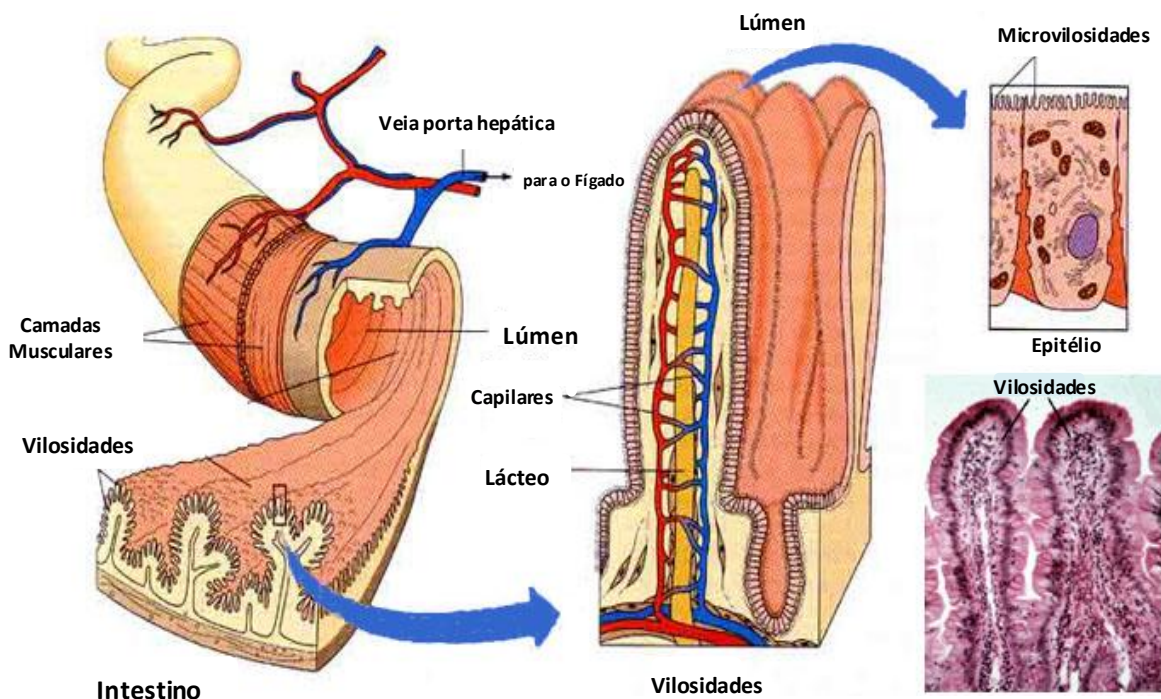
2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Fisiologia do Intestino Delgado

O intestino delgado é um tubo alongado, composto de três partes: duodeno, jejuno e íleo. A área de absorção da superfície luminal da mucosa do intestino delgado é aumentada 600 vezes pela presença de pregas, vilosidades e microvilosidades (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2011).

As vilosidades são projeções da mucosa em forma de dedos de luva, representam cerca de 10 milhões e são visíveis ao microscópio óptico (Figura 1). Cada vilosidade intestinal é coberta por uma camada de células epiteliais colunares chamadas enterócitos e na base das vilosidades estão as criptas de Lieberkuhn ou glândulas intestinais. As microvilosidades compõem uma camada superficial de glicoproteínas, denominada glicocálice, que contém os transportadores e enzimas intestinais (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2011).

Figura 1 - Esquema das Vilosidades e Microvilosidades intestinais



(Modificado: <http://reflexologia-vozdaalma.blogspot.com.br/2012>)

A fisiologia normal do transporte de fluido gastrointestinal ocorre de forma natural, se um indivíduo fizer a ingestão de dois litros de líquidos por dia, com alimentos e bebidas, o intestino delgado receberá de oito a dez litros de líquidos, estes provenientes da secreção digestiva que chega à luz na forma de saliva, suco gástrico, bile ou suco pancreático, através das células das criptas intestinais (WENZL, 2012).

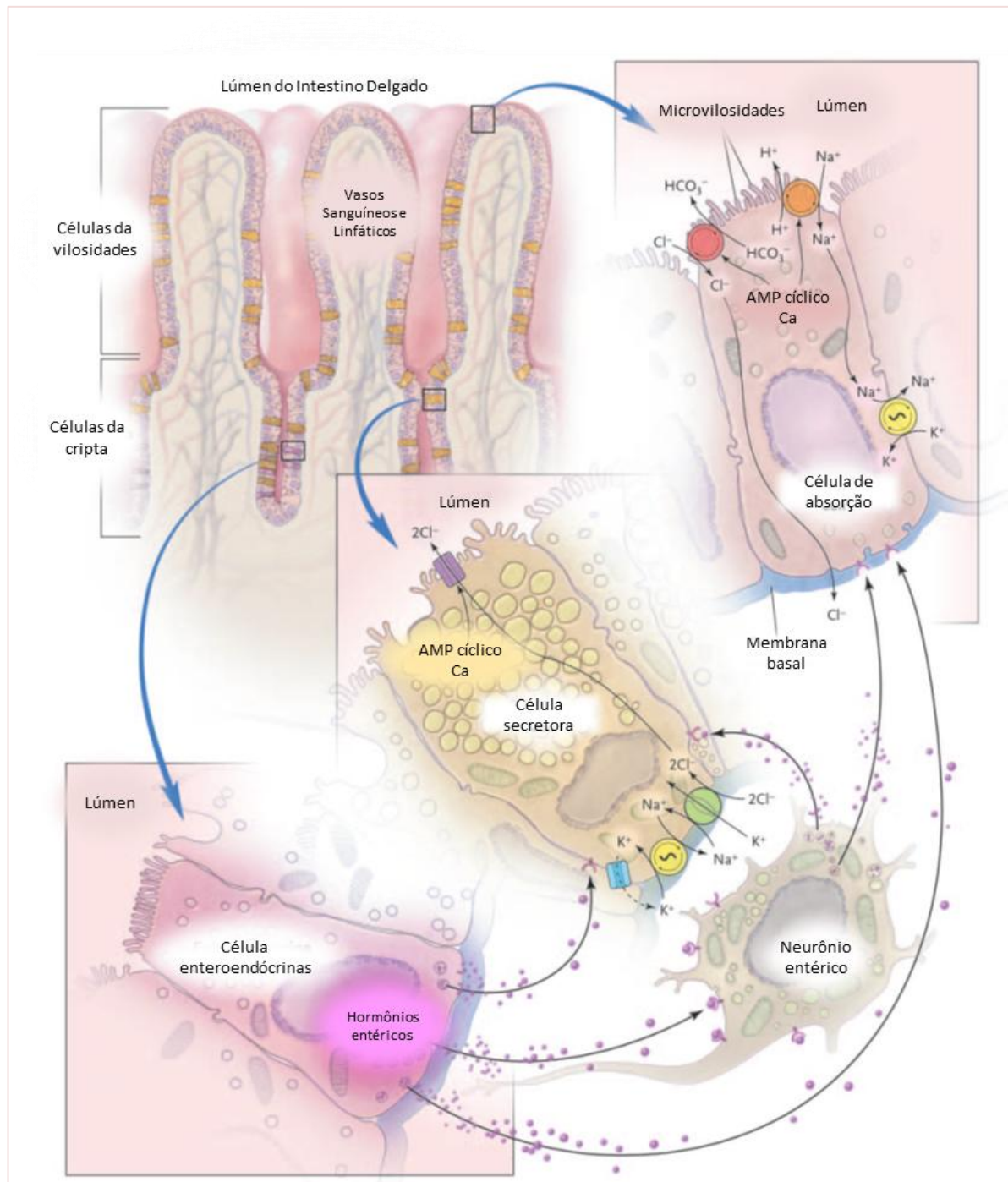
A maior parte da água é absorvida no intestino delgado, e cerca de 600 a 1500 mL passa pela válvula ileocecal. No cólon, quase toda a água que não está firmemente ligada ou associada aos sólidos fecais (como fibras não digeridas e bactérias) é ativamente absorvida e apenas 100 mL são eliminados através das fezes. Sob condições normais, cerca de 99% da carga de fluido exógena e endógena é absorvida pelo intestino delgado e cólon e se apenas um por cento escapa da absorção, o excesso de água torna a consistência das fezes mais fluida (WENZL, 2012).

Os processos de secreção no intestino delgado geralmente ocorrem em células da cripta, enquanto que os processos de absorção estão localizados em células das vilosidades (Figura 2). Células enteroendócrinas são escassas, mas estão presentes na cripta. Quase todas as doenças diarreicas são associadas com a secreção de fluido. Esta secreção é na maioria das vezes secundária à estimulação da secreção ativa de íons cloreto (Cl^-) e a inibição da absorção ativa de íons sódio (Na^+) e Cl^- (por mensageiros, tais como o AMP cíclico), que envolvem o acoplamento de troca de hidrogênio (H^+) com Na^+ e Cl^- com íons bicarbonato (HCO_3^-). Os processos de absorção e secreção são regulados tanto pelo sistema nervoso entérico quanto por hormônios entéricos, embora o papel dos hormônios entéricos ainda não esteja esclarecido (BINDER, 2009).

Os peptídeos guanilina e uroguanilina são hormônios que ativam receptores guanilato-ciclase C (GC-C) e regulam a secreção de sal e de fluidos no intestino. A elevação de Monofosfato Cíclico de Guanosina (GMPc) no intestino acarreta um incremento na secreção de eletrólitos e água. Após a estimulação da GC-C, a guanilina induz o aumento da concentração de GMPc, que medeia a fosforilação e ativação do regulador de condutância transmembrana do canal de Cl^- na fibrose cística (CFTR), o nome dado refere-se à expressão anormal do gene codificador do CFTR em crianças com fibrose cística (KOTS et al., 2008; WONGSAMITKUL et al,

2010). A capacidade absorptiva de secreção hidroeletrólítica pelo intestino delgado gira em torno de 18 litros e do cólon 3,8 litros. Quando este volume é ultrapassado, a diarreia aparece (BARBUTI, 2008).

Figura 2 - Regulação dos processos de absorção e secreção no intestino



(BINDE R, 2009 modificado)

2.2 Diarreia

A diarreia pode ser definida pelo aumento da produção anormal de fezes de consistência líquida, usualmente associada à frequência excessiva de defecação (ARANDA-MICHEL, 1999; DEEPAK, 2011). É provocada pelo aumento da motilidade e de secreções no trato gastrointestinal (MAXWELL, 2012; SWEETSER, 2012).

A maioria dos pacientes consideram fezes moles como a característica prioritária para diagnosticar a diarreia, outros usam a frequência das evacuações diárias. Esta depende em grande parte da dieta e varia consideravelmente de pessoa para pessoa. O normal considerado é ser a partir de dois movimentos intestinais por dia a três evacuações por semana. Quantidades maiores de evacuações podem ser normais quando a dieta for rica em fibras (SCHILLER, 2000 e 2012).

Segundo a OMS e a UNICEF (Fundo das Nações Unidas para a Infância), as doenças diarreicas são a terceira causa de morte em todo o mundo, a maioria em países em desenvolvimento. As doenças diarreicas constituem um problema de saúde pública. Apesar de suas imprecisões, as estatísticas relacionadas a diarreia, mostram que é uma das principais causas de mortalidade infantil entre 0 e 5 anos, correspondendo a 1,9 milhões de crianças que morrem de diarreia a cada ano nestes países. Isso significa que 18% das crianças com menos de 5 anos estão morrendo todos os dias como resultado de doenças diarreicas (FARTING, 2013; HOU et al, 2013).

As diarreias podem ser multifatoriais, envolvendo mecanismos que regulam a permeabilidade da mucosa, o transporte intestinal, a motilidade e o metabolismo do intestino. A proteção da mucosa e microcirculação podem ser comprometidas pela inibição da ciclo-oxigenase (COX) e das prostaglandinas, que podem levar à lesão da mucosa e a ativação da resposta imune inata (ABRAHAM, 2012).

A história dos sintomas da doença é a chave para a avaliação de pacientes com diarreia. Esta se classifica quanto à duração, em agudas, quando têm duração de menos de quatro semanas e são mais propensas a terem uma causa infecciosa. E crônica, a qual tem duração de mais de quatro semanas e um grupo muito maior

de diagnósticos, incluindo não só problemas infecciosos, mas também uma variedade de outras condições (SCHILLER, 2000; SWEETSER, 2012).

As diarreias podem classificar-se também quanto ao mecanismo fisiopatológico em: osmótica, secretória, esteatorréia (síndrome disabsortiva), inflamatória e funcional. A funcional é causada pela hipermotilidade intestinal, os principais exemplos são a síndrome do intestino irritável (pseudo-diarreia) e a diarreia diabética, esta em geral é noturna ou pós-prandial, estando frequentemente associada à incontinência fecal e a consistência das fezes é frequentemente aquosa (FOSS-FREITAS et al, 2008; DEEPAK, 2011).

Diarreia osmótica ocorre quando uma substância ingerida tem atividade osmótica e é fracamente absorvida. Estas substâncias retêm a água dentro do intestino, pois a água é livremente permeável no intestino e o conteúdo intestinal está em equilíbrio osmótico com os fluidos corporais. Exemplos dessas substâncias incluem magnésio, compostos de fosfato ou de sulfato que contém hidratos de carbono, fracamente absorvidos, e polímeros, tais como polietileno glicol (SCHILLER, 2012). Os efeitos secundários destas substâncias estão relacionados a distúrbios metabólicos resultantes da absorção excessiva de íons, bem como a perda de fluido a partir de desidratação fecal (DEEPAK, 2011).

Diarreia secretória se manifesta com fezes volumosas que persistem mesmo com a falta de ingestão oral. O intestino delgado apresenta excesso de fluido e de secreção de eletrólitos devido à diminuição de absorção de água, com isso ocorre uma sobrecarga no cólon em relação à absorção de água e eletrólitos resultando em um aumento de água nas fezes e diarreia (Figura 3). Estes doentes são caracterizados como tendo diarreia secretória ou hipersecretória devido à composição de eletrólitos nas fezes assemelhar-se à observada em pacientes com a cólera (DEEPAK, 2011; SCHILLER, 2012).

Esses processos secretórios do epitélio intestinal ocorrem predominantemente nas criptas de Lieberkühn. Os eletrólitos envolvidos são Cl^- e HCO_3^- . A secreção de íons Cl^- na membrana apical ocorre pela abertura de canais iônicos, o principal é o regulador transmembrana da fibrose cística (CFTR). Os mensageiros intracelulares, Monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) e GMPc regulam o funcionamento do CFTR por meio da ativação de proteínas quinases. Dessa forma, processos patológicos que resultam no aumento da concentração

intracelular de AMPc promovem a ativação da proteína quinase A (PKA), abertura dos canais iônicos CFTR com consequente secreção de Cl^- (VANNUCCI e GUEDES, 2009; HOSTOS et al, 2011; DONOWITZ, 2012).

Figura 3 - Esquema da diarreia secretória (\uparrow Secreção ativa de íons e \downarrow absorção de água)



Modificado: <http://www.slideshare.net/drsmngm/diarrhea-17509569>

Na maioria dos casos de diarreia, o mecanismo ocorre pelo aumento da velocidade com que o conteúdo intestinal passa pelos sítios de absorção intestinal impedindo que esta possa ser concluída. Diarreias devido ao trânsito rápido podem ter características de uma do tipo secretória com excesso de água e absorção incompleta de eletrólitos ou do tipo osmótica, se o processo digestivo e de absorção de substâncias osmoticamente ativas não está concluído (SCHILLER, 2012).

Água em excesso pode permanecer no lúmen através de um dos três mecanismos patofisiológicos: a taxa de absorção de fluido do intestino pode ser reduzida; a taxa de secreção de fluido pelo intestino pode ser aumentada; ou, ocorrer má absorção dos materiais ingeridos com atividade osmótica (SCHILLER, 2012).

Diarreias aquosas envolvem mudanças no transporte de íons, tempo de trânsito reduzido, ou motilidade aumentada. Diarreias inflamatórias, geralmente, apresentam muco e pus, e diarreia gordurosa está associada à má digestão ou má absorção e pode ser clinicamente associada à perda de peso e esteatorréia (aumento da eliminação de gordura fecal) (ABRAHAM, 2012).

A diarreia inflamatória é decorrente da liberação de citocinas e mediadores inflamatórios na mucosa intestinal. Pode ser infecciosa, mascarada pela presença de muco, pus ou sangue nas fezes, ou não infecciosa. Esta última, comumente é causada pelo uso de drogas como, agentes imunossupressores, quimioterápicos, antibióticos ou anti-inflamatórios não esteroidais (AINES). O equilíbrio entre a absorção e a secreção pode ser perturbado por uma alteração na relação entre a maturidade das vilosidades e as células da cripta imaturas. A inibição da proliferação epitelial intestinal por essas drogas leva a uma perda da homeostase do epitélio intestinal (equilíbrio de absorção, secreção, e as funções de motilidade) e necrose superficial que pode contribuir para o desenvolvimento de diarreia (ABRAHAM, 2012).

As diarreias infecciosas devem ser consideradas como uma causa de diarreia inflamatória (SCHILLER, 2012). Os organismos geralmente envolvidos incluem *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Entamoeba coli*, *Entamoeba histolytica* and *Yersinia* (ARANDA-MICHEL, 1999). Esses microrganismos liberam a enterotoxina estável ao calor, que se liga ao receptor de membrana das células epiteliais intestinais, e ativa a enzima para aumentar a síntese de GMP cíclico, acarretando a ativação de CFTR. A ativação de CFTR aumenta o transporte de íons cloreto no lúmen intestinal e acúmulo dos íons de sódio e de água, provocando assim a diarreia (KOTS et al, 2008; WONGSAMITKUL et al, 2010).

Os antibióticos são responsáveis por 25% da diarreia induzida por fármacos. Eles podem alterar a flora intestinal e a tolerância a bactérias entéricas, que podem levar à ativação do sistema imunitário (ABRAHAM, 2012). A diarreia inflamatória é caracterizada por evacuações frequentes e de pequeno volume com sangue nas fezes e apresentando dor abdominal, leucócitos nas fezes, elevação da Proteína C Reativa (PCR) e diminuição dos níveis de albumina sérica (SWEETSER, 2012).

A Proteína C Reativa é um marcador amplamente disponível na inflamação aguda. É produzida nos hepatócitos em pequenas quantidades (<1 mg/L), que tem uma meia-vida curta em comparação com outras proteínas de fase aguda. Com a inflamação, os níveis da PCR aumentam rapidamente e esta, normalmente é detectada no sangue. O estímulo primário para a síntese da PCR ocorre a partir da liberação da interleucina-6 e de outros fatores como o de necrose tumoral e a interleucina-1B (DENARDI, 2008; TSAMPALIEROS, 2011).

2.2.1 Terapêutica da Diarreia

O tratamento clínico da diarreia aguda preconizado pela Organização Mundial de Saúde é basicamente a Terapia de Reidratação Oral (TRO), no entanto, esta não diminui significativamente a saída das fezes e a duração da diarreia. Portanto, outras abordagens, têm sido utilizadas. Estudos recentes têm demonstrado o efeito benéfico da suplementação com zinco para o tratamento da diarreia em crianças mal alimentadas. Já que o zinco não é armazenado no corpo, e seu nível no organismo é determinado pelo equilíbrio entre a ingestão, a absorção e as perdas. Crianças mal alimentadas e com diarreia aguda, podem apresentar um estado de deficiência de zinco em consequência da perda intestinal (LUKACIK et al, 2008; MCCLARREN et al, 2011; PASSARIELLO et al, 2011; DONOWITZ, 2012).

Não foram encontrados estudos avaliando o papel do zinco no tratamento da diarreia infecciosa aguda em adultos. Nestes, os sintomas de diarreia infecciosa pode muitas vezes ser significativamente melhorado pela administração de loperamida ou difenoxilato (combinado com atropina). Ambos são agentes antimotilidade e não devem ser dados na presença de febre, dor severa, ou fezes disentéricas (BLUSH & MATZO, 2012).

Embora os antibióticos e agentes antimotilidade sejam por vezes prescritos concomitantemente, esta prática tem eficácia desconhecida. O uso de subsalicilato de bismuto é um pouco limitado por uma série de interações medicamentosas e atualmente tem uma recente recomendação contra o uso na população pediátrica devido à relação entre a aspirina e síndrome de Reye. Racecadotril é um fármaco puramente antissecretório que tem sido utilizado com sucesso em crianças e adultos, está em uso difundido internacionalmente, porém não nos Estados Unidos. Uso de probióticos tem recebido atenção como profilaxia e tratamento eficaz na diarreia infecciosa. A OMS define probióticos como “organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro” (MCCLARREN et al, 2011).

A terapia com antibióticos é indicada nos casos de diarreia infecciosa, guiada por meio de testes de sensibilidade, mas geralmente é iniciada com fluoroquinolonas por causa da resistência generalizada à ampicilina, sulfonamidas, tetraciclina, e

cloranfenicol e resistência à ciprofloxacina e emergentes (GOODGAME, 2006; MCCLARREN et al, 2011).

Atualmente os medicamentos antidiarreicos comumente utilizados como loperamida, difenoxilato, vários agentes de ligação, e antimicrobianos podem não ser seguros ou serem ineficazes em diarreia aguda e, portanto, não são recomendados para uso clínico de rotina. Seu mau uso aumenta não só o custo do tratamento e expõe bebês e crianças aos potenciais efeitos tóxicos, mas também desvia a atenção dos profissionais de saúde para terapias mais racionais, como TRO e práticas de alimentação apropriadas. Algumas pesquisas mostram que o uso da loperamida em crianças, particularmente as menores de três anos, tem pouco ou nenhum benefício e pode causar efeitos colaterais graves como: depressão do sistema nervoso central, inchaço e constipação (MITTAL & MATHEW, 2001).

Apesar dos modernos medicamentos antidiarreicos conhecidos no mercado farmacêutico e soluções de plantas medicinais serem utilizadas com sucesso para o tratamento desta doença, poucas plantas são quimicamente ou biologicamente investigadas a fim de determinar a sua eficácia e constituintes ativos. No entanto, a pesquisa científica seria a maneira eficaz de identificar plantas e avaliar suas alegadas atividades biológicas (MAXWELL et al, 2012).

Algumas opções terapêuticas para os principais tipos de diarreia são apresentadas na tabela 1, bem como algumas funções das opções terapêuticas.

Tabela 1 - Opções terapêuticas para a diarreia

OPÇÕES TERAPÊUTICAS	
Diarreia Aguda	Reidratação Oral (Repor perdas de água e eletrólitos) + Dieta (evitar alimentos hiperosmolares)
Diarreia Persistente	Zinco suplementar, multivitaminas e minerais + Dieta (evitar alimentos hiperosmolares)
TRATAMENTO ANTIDIARREICO INESPECÍFICO	
	Antimotilidade:
	<u>Loperamida</u>
Diarreia Secretória	<ul style="list-style-type: none"> • adultos e crianças > 8 anos • Inibe a peristaltismo intestinal e tem propriedades antissecretórias leves • Deve ser evitado na diarreia inflamatória
	<u>Subsalicilato de bismuto</u>
	<ul style="list-style-type: none"> • Agente antissecretor: diminui a produção de fezes em crianças bem como os sintomas de diarreia, náuseas, e dor abdominal
	<u>Racecadotril</u>
	<ul style="list-style-type: none"> • Agente antissecretor: inibidor da encefalinase (não-opiáceo) com atividade anti-secretora, que foi agora licenciado em muitos países para uso pediátrico
Diarreia Aguda	Adsorventes:
	<u>Caulim-pectina, carvão ativado, atapulgita</u>
	<ul style="list-style-type: none"> • Prova de eficácia inadequada na diarreia aguda do adulto
Diarreia Infeciosa	Antimicrobianos

Tabela extraída do WGO, 2008 e WENZL, 2012

2.2.2 Óleo de Rícino

O óleo de rícino é um triglicérido natural contendo, principalmente, o ácido ricinoleico, tem uma longa história como remédio, devido aos seus vários efeitos biológicos, incluindo um aumento da motilidade intestinal propulsiva e estímulo a secreção de água e eletrólitos. É conhecido por induzir acúmulo de substâncias no lúmen intestinal e diminuir a permeabilidade aos íons Na^+ e Cl^- , semelhante ao observado nos casos de diarreia secretória (AMABEOKU e BAMUAMBA, 2010). O seu efeito é mediado pelo ácido ricinoleico que pode induzir a uma resposta hipersecretoria pela parede intestinal, levando a diarreia (ROUF et al., 2007; TAFESSE e MEKONNEN, 2012).

Após a ingestão oral do óleo, o ácido ricinoleico é liberado por lipases no lúmen intestinal, e uma quantidade considerável desse ácido é absorvido no intestino induzindo a um forte efeito laxante (TUNARU et al., 2012). Segundo Amabeoku e Bamuamba (2010), o óxido nítrico parece estar envolvido no mecanismo da diarreia induzida por esse óleo.

As prostaglandinas (PGs) desempenham um papel fundamental na geração da resposta inflamatória. A biossíntese, está relacionada a inibição da atividade da enzima ciclooxigenase (COX), e aumenta significativamente em tecidos inflamados, o que contribui para o desenvolvimento dos sinais da inflamação aguda. A COX-1 produz as PGs responsáveis pela integridade da mucosa, a sua inibição acarreta o bloqueio da síntese de PGE₂, comprometendo um dos mecanismos de proteção e manutenção da integridade da mucosa gastrointestinal (MUSUMBA, PRITCHARD e PIRMOHAMED, 2009).

Segundo Ricciotti e Fitzgerald (2011), PGE₂ é uma das PGs mais abundantes produzidas no corpo, é um mediador importante de muitas funções biológicas, tais como a regulação das respostas imunitárias, pressão sanguínea, integridade gastrointestinal e fertilidade. Na inflamação, PGE₂ é envolvida em todos os processos que levam aos sinais clássicos da inflamação: vermelhidão, inchaço e edema que resultam do aumento do fluxo sanguíneo para o tecido inflamado através do aumento de PGE₂ mediado pela dilatação arterial e aumento da permeabilidade dos microvasos (RICCIOTTI e FITZGERALD, 2011).

2.3 Plantas do Semiárido

Vários estudos etnobotânicos têm observado uma grande familiaridade das populações locais pelo uso de plantas, o que indica que este conhecimento pode fornecer informações para a gestão e conservação de espécies vegetais. No semiárido brasileiro, um amplo conhecimento com o uso de plantas medicinais pela população local no ecossistema da Caatinga tem sido documentado, incluindo estudos para investigar o uso de plantas medicinais e suas implicações para a conservação (JÚNIOR et al, 2012).

No semiárido brasileiro, região que ocupa 11,5% do território nacional, estima-se haver oito mil espécies vegetais sendo que destas, 318 espécies são endêmicas da caatinga pertencentes a 42 famílias botânicas. Diante dessa vasta biodiversidade e da necessidade da descoberta de novas moléculas bioativas, é de fundamental importância o estudo farmacológico da flora dessa região, ainda pouco estudada sob esse aspecto (BOLIGON et al, 2012). O estudo de usos tradicionais de plantas e seus produtos na região Nordeste do Brasil vem aumentando progressivamente nos últimos anos, embora, ainda existam muitas lacunas em nosso conhecimento em relação às plantas medicinais usadas nesta região (AGRA, 2008).

As populações humanas convivem com uma grande diversidade de espécies vegetais, desenvolvendo maneiras particulares de explorá-las para finalidades distintas, usando-as como alternativa de sobrevivência e para fins terapêuticos. Segundo Oliveira et al. (2010), no semiárido nordestino 32,3% das espécies cultivadas empregadas na medicina caseira local são encontradas principalmente nos quintais, nas proximidades das residências e nos locais de cultivo, sendo frequentes *Spondias purpurea* (seriguela), *Psidium guajava* (goiaba) e *Malpighia emarginata* (acerola). Ressalta-se que a folha é a parte do vegetal mais utilizada, representando 31,5% dos casos, com diferentes usos e indicações terapêuticas, como dor de cabeça, diarreia, febre, cólica intestinal e inflamações dentre outros (OLIVEIRA et al, 2010).

A cultura do uso de plantas com propriedades terapêuticas vem sendo valorizada pela sociedade do mundo inteiro devido à busca por hábitos de vida mais saudáveis. Nessa tentativa, crescem as pesquisas por medicamentos naturais, biossustentáveis que possam minimizar possíveis efeitos colaterais de

medicamentos convencionais. Com isso, os produtos naturais continuam a desempenhar um papel importante em programas de desenvolvimento de drogas (GACHET et al, 2010).

Diante dessa vasta biodiversidade e da necessidade da descoberta de novas moléculas bioativas, é de fundamental importância o estudo de possíveis potenciais terapêuticos da flora dessa região, ainda pouco estudada.

2.3.1 Espécie Vegetal Selecionada para Estudo

A família Anacardiaceae, a qual pertence o gênero *Spondias purpurea*, compreende aproximadamente 800 espécies (PELL, et al., 2011) e destas, segundo Stark et al. (2013), muitas tem indicação para diarreia, como é o caso *Ozoroa paniculosa*, *Protorhus longifolia*, *Rhus lancea*, *Scleoracarya birrea* e *Spondias mombin*. São principalmente árvores e arbustos que crescem em áreas tropicais, zonas subtropicais e temperadas. Do ponto de vista fitoquímico, os membros da Família Anacardiaceae são ricos em metabólitos secundários, particularmente compostos fenólicos com interessantes atividades biológicas. Portanto, muitas espécies desta família também têm sido utilizadas como plantas medicinais (WIART, 2006 e ENGELS et al, 2012).

O gênero *Spondias*, compreende cerca de 20 espécies, algumas nativas dos Neotrópicos e cerca de 10 espécies nos trópicos da Ásia. No Nordeste do Brasil, algumas *Spondias* são cultivadas em fundos de quintais ou em pequenos pomares, incluindo o umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Camara), ciriguela (*S. purpurea* L.), cajá (*S. mombin* L.), umbu-cajá (*Spondias* sp.), cajá-manga (*S. cytherea* Sonn) e umbuguela (*Spondias* sp) (SANTOS, 2008).

Estudos fitoquímicos realizados com as folhas de *Spondias mombim* revelaram a presença de compostos bioativos como taninos, saponinas, alcaloide e compostos fenólicos comprovando o potencial da planta como fonte de compostos com atividade biológica (NJOKU e AKUMEFULA, 2007).

Na literatura há alguns relatos do uso de espécies do gênero *Spondias* na medicina tradicional. Estudos de *Spondias mangifera* demonstraram atividade gastroprotetora, antidiarreica, antimicrobiana e tratamento da dor articular reumática e muscular (ARIF et al, 2008 e 2011). *Spondias pinnata* apresenta atividade

antioxidante de diferentes extratos comprovada, devido à presença de fenóis e flavonóides (SATPATHY et al, 2011).

2.3.2 *Spondias purpurea* L.

Seriguela (*Spondias purpurea* L.) é uma fruta nativa da América Central, dispersas no México, na Guatemala e no Caribe, e em alguns países da América do Sul, principalmente na região nordeste do Brasil região do semiárido. Dependendo da região geográfica pode ser conhecida como vermelho mombin, roxo mombin, ciruela, siriguela, seriguela, ameixa espanhola, ameixa, ameixa mexicana, ceriguela, ciriguela, couve-flor, couve-flor da coroa, jobillo, cajá ou jacote (AUGUSTO et al, 2012).

As árvores são pequenas (3-10m) produzem frutos ovais que dependendo da variedade, variam amplamente na cor de verde para amarelo, laranja, vermelho e violeta, com a pele lisa e brilhante que amadurecem ao longo do ano. Os frutos apresentam-se com até 5,5 cm de comprimento e pesam 12-28 g. As folhas são compostas por 9 a 11 pares de folíolos oblongos, com 2 a 2,5 centímetros de comprimento, bordas lisas e de cor verde-escura (Figura 3) (ENGELS, 2012).

Figura 4 - Árvore adulta de *Spondias purpurea* L. (A) e em detalhes folhas (B)

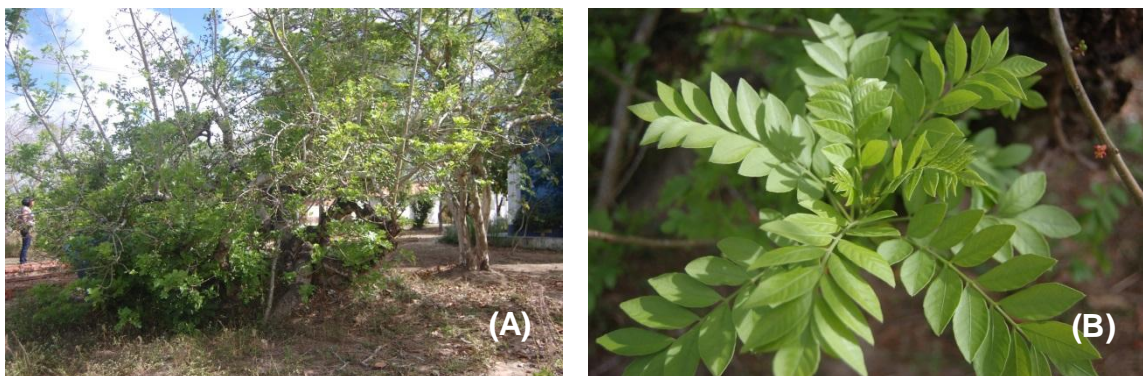


Foto de Katharina Porto

Diante da necessidade de buscar novos produtos como alternativa terapêutica no tratamento da diarreia e mediante as atividades biológicas apresentadas pelos constituintes químicos da família Anacardiaceae, e pela indicação da atividade antidiarreica de uso popular, a *Spondias purpurea* L. foi selecionada para estudo frente a esta atividade, objetivando avaliar da atividade antidiarreica do extrato

etanólico bruto e da fase diclorometano obtidos das folhas de *Spondias purpurea* L. (Anacardiaceae). O critério de escolha para a utilização do extrato etanólico e fase diclorometano obtidos de *Spondias purpurea* L., foi o etnofarmacológico e quimiotaxonômico.



Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antidiarreica do extrato etanólico bruto e da fase diclorometano obtidos das folhas de *Spondias purpurea* L. em modelos animais.

3.2 Objetivos Específicos

- Obter o extrato etanólico bruto e fase, a partir das folhas da espécie *S. purpurea*;
- Fazer a determinação fitoquímica de polifenóis e flavonoides totais a partir do extrato etanólico bruto de *S. purpurea*;
- Realizar estudos toxicológicos de *S. purpurea* através do bioensaio com *Artemia Salina* Leach e do ensaio toxicológico pré-clínico agudo e determinar a dose letal 50 % (DL₅₀);
- Analisar os perfis hematológico e bioquímico no ensaio toxicológico pré-clínico agudo;
- Identificar a atividade antimicrobiana do extrato etanólico bruto e da fase diclorometano de *S. purpurea*;
- Relatar a atividade antidiarreica do extrato etanólico bruto e da fase diclorometano, no modelo clássico de indução de diarreia por óleo de rícino;
- Realizar os ionogramas e avaliar o marcador anti-inflamatório através da dosagem da Proteína C Reativa frente ao modelo clássico de indução de diarreia por óleo de rícino, em ratos tratados com extrato etanólico e fase diclorometano;

- Analisar a histologia do íleo dos ratos submetidos ao modelo de clássico de indução de diarreia por óleo de rícino e tratados com fase diclorometano *S. purpurea*;
- Determinar a atividade antimotilidade gastrointestinal de *Spondias purpurea* através no modelo de esvaziamento gástrico e trânsito intestinal.



Metodologia

4. METODOLOGIA

4.1 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1.1 Local da Pesquisa

As folhas de *Spondias purpurea* L. foram coletadas na Reserva Particular do Patrimônio Natural, da Fundação Universitária de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão (FURNE), localizada na fazenda Ligeiro, município de Campina Grande, estado da Paraíba. E o extrato foi preparado no Laboratório de Desenvolvimento de Medicamentos (LABDEM) da Universidade Estadual da Paraíba.

Os estudos de toxicidade e investigação das atividades antimicrobiana, antidiarreica, antimotilidade e toxicológica foram realizados nos Laboratórios de Atividade Antimicrobiana, Ensaio Farmacológicos e de Análises Clínicas da Universidade Estadual da Paraíba e no Biotério do Centro de Ensino Superior e Desenvolvimento (CESED/FACISA). Já a análise histológica foi realizada no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste-CETENE/INT-Nordeste.

4.1.2 Obtenção do Extrato Etanólico Bruto e Fases

4.1.2.1 Material Botânico

O material botânico utilizado para os experimentos foram folhas da espécie *S. purpurea* L. coletadas na FURNE (Figura 5). Esta espécie foi identificada pelo Prof. Ivan Coelho Dantas e sua exsicata depositada no Herbário ACAM - Manoel de Arruda Câmara da Universidade Estadual da Paraíba sob número 128.

Figura 5 - Coleta de folhas de *S. purpurea*: árvore (A), folhas coletadas (B) e folhas secas (C)

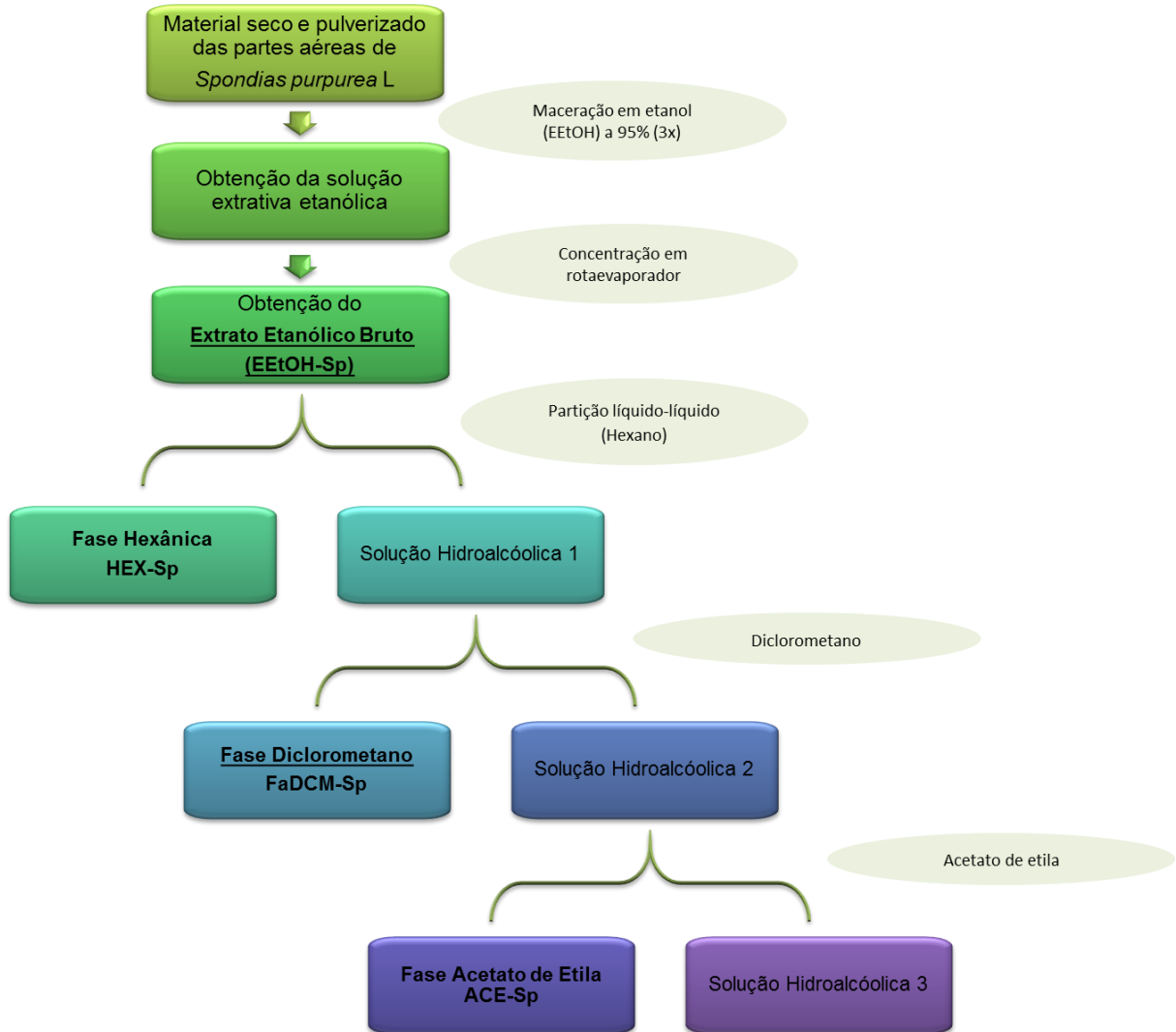


Fotos de Katharina Porto

4.1.2.2 Preparação do Extrato Etanólico Bruto e Fases

As folhas de *S. purpurea* L. foram submetidas à secagem em estufa de circulação de ar, a uma temperatura de 40°C até a obtenção de um teor de umidade constante. Após a secagem, o material vegetal foi triturado em moinho de facas, com granulometria em torno 10 mesh. O pó obtido foi submetido à extração por percolação com álcool etílico (P.A.). A solução extrativa produzida foi concentrada em rotaevaporador, obtido o extrato etanólico bruto (EEtOH-Sp). A partir deste, realizou-se a partição líquido-líquido com solventes de ordem crescente de polaridade: hexano, diclorometano e acetato de etila; resultando nas respectivas fases (Figura 6).

Figura 6 - Marcha fitoquímica utilizada na obtenção do Fase Diclorometano (FaDCM-Sp), a partir do EEtOH produzido de folhas de *S. purpurea*



4.1.3 Prospecção Fitoquímica

4.1.3.1 Determinação de polifenóis totais

O conteúdo de polifenóis totais do extrato vegetal de *S. purpurea* L. foi determinado por meio de espectroscopia na região do visível, através do método de Folin-Ciocalteu descrito por Chandra e Mejia (2004), com adaptações. O EEtOH-Sp (25 mg) foi dissolvido em água destilada, e filtrado conforme o caso, e posteriormente transferidos para um balão volumétrico de 25 mL. Esta solução foi diluída de modo a obter uma concentração final de 200 µg/mL. Desta solução foi retirada, uma alíquota de 1 mL e adicionada a 1 mL do reagente de Folin-Ciocalteu 1N. Esta mistura permaneceu em repouso durante 2 minutos antes da adição de 2 mL da solução de Na₂CO₃ a 20% (p/v). A solução foi deixada em repouso pelo período de 10 minutos e posteriormente foi realizada a leitura no comprimento de onda de 757 nm em espectrofotômetro UV mini – 1240, marca Shimadzu, tendo como “branco” água destilada. A curva de calibração foi obtida com solução estoque de ácido gálico (1mg mL⁻¹), da qual foram feitas diluições seriadas nas concentrações 1, 3, 6, 9, 12, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 µg mL⁻¹ em balões volumétricos de 10 mL. As leituras foram realizadas da mesma forma descrita anteriormente, substituindo-se a amostra do extrato vegetal pela solução de ácido gálico. O conteúdo total de polifenóis foi expresso em miligramas equivalentes do padrão utilizado.

4.1.3.2 Determinação de Flavonoides totais

O total de flavonoides foi determinado através do método descrito por Meda et al., (2005). Inicialmente 5 mL do extrato etanólico de *S. purpurea* foi diluído em metanol para obter uma solução com concentração 500 µg/ml. A 5 mL da solução foi adicionado o mesmo volume da solução de AlCl₃ a 2% em metanol (p/v). Esta mistura permaneceu em repouso durante 10 minutos antes da leitura da absorbância no comprimento de onda de 415 nm. Foram realizadas ainda leituras do extrato com metanol no lugar da solução de AlCl₃ e o valor da absorbância da leitura anterior foi subtraído do valor desta para que a coloração do extrato não influenciasse na

absorbância, superestimando a quantidade de flavonoides. A amostra do “branco” consistiu em metanol. O total de flavonoides foi determinado utilizando a curva de calibração utilizando quercetina (Sigma–Aldrich Chemie, Steinheim, Germany) nas concentrações 2, 4, 6, 8, 10, 13, 16, 19, 22, 26, 28 e 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e expresso em mg equivalente de quercetina.

4.1.4 Ensaios Toxicológicos de *S. purpurea* L.

4.1.4.1 Determinação da Concentração Letal 50% (CL50)

Para a avaliação toxicológica da CL50 das amostras obtidas de *S. purpurea* foram utilizados cistos de *Artemia salina* (Leach), crustáceo da classe Anostracea (Brine Shrimp Test), provenientes do Laboratório de Ensaios Farmacológicos da Universidade Estadual da Paraíba. As larvas de *Artemia salina* foram utilizadas, na forma de náuplio, usando a Concentração Letal Média (CL50) como parâmetro de avaliação da atividade toxicológica.

As substâncias foram solubilizadas em água salina. Partindo-se de uma solução mãe de 10 mg/mL, foram efetuadas diluições para concentrações de 25, 50, 100, 250, 500, 750 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ para o extrato ou a fase diclorometano de *S. purpurea*. Para a obtenção dos metanáuplios de *A. salina* (Leach), foram colocados 25 mg de ovos (cistos) em água salina artificial (NaCl 6,3 g/L; KCl 0,75 g/L; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1,47 g/L; $\text{NaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5,10 g/L; NaHCO_3 0,21 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 6,20 g/L; pH 8-9 e 29°C) sob iluminação artificial por 48 h. Em seguida foram colocados 10 mL das diferentes concentrações do extrato etanólico ou fase diclorometano de *S. purpurea*, em tubos de ensaio e adicionado de 10 metanáuplios. Cada concentração foi testada em triplicata. Um grupo controle foi preparado contendo apenas o solvente e as larvas. O conjunto foi incubado sob luz artificial por 24 h e após esse período foi realizada a contagem do número de larvas vivas e mortas para determinação da CL50 (LOPES et al., 2004).

4.1.4.2 Ensaio Toxicológico Pré-clínico Agudo e Determinação da DL50

O experimento foi realizado de acordo com as normas descritas na Resolução 90/2004, que dispõe sobre a publicação do "Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos".

Ratos *Ratus norvegicus* albinos machos e fêmeas, linhagem Wistar pesando entre 180-280g todos provenientes do Biotério do Centro de Ensino Superior e Desenvolvimento (Figura 7). Os animais foram aclimatados às condições do laboratório, por cerca de sete dias, antes dos ensaios experimentais. Sob temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclo claro-escuro controlado de 12 horas. Os animais foram alimentados com ração Purina tipo pellets e água *ad libitum*, sendo distribuídos nos diferentes grupos experimentais, ao acaso.

Figura 7 - Rato Wistar (*Rattus norvegicus*)

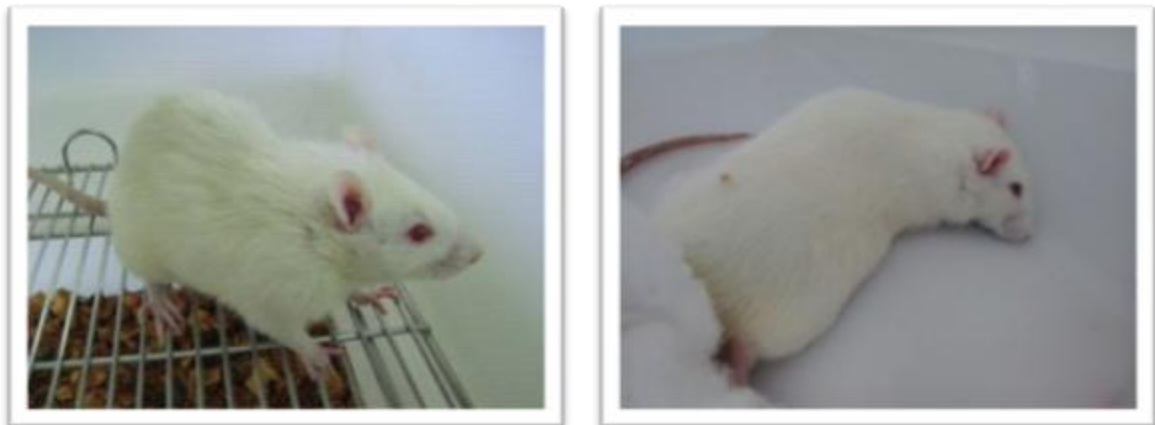


Foto de Katharina Porto

Para a realização do experimento, os animais foram submetidos a um jejum 12 horas como preconizado na metodologia empregada, em seguida foram divididos em 4 grupos, sendo 2 grupos de machos e 2 grupos de fêmeas. Cada grupo recebeu o veículo ou o extrato etanólico de *S. purpurea*, solubilizadas em solução de NaCl 0,9%, na dose de 2000 mg/kg, por via oral (gavagem). Uma série de parâmetros comportamentais (Anexo 1) bem como se houve morte, foram observados durante as 4 primeiras horas, nos intervalos de 30 minutos, 1, 2, 3, 4 horas e durante os 14 dias de

experimento. De forma que ocorrendo qualquer alteração comportamental em decorrência de tratamentos seria possível inferir uma relação com a atividade no sistema nervoso central (ALMEIDA et al., 1999).

Durante o período de observação foi mensurado como parâmetro, a ingestão de água e ração pelos animais. A pesagem dos ratos foi realizada antes da administração do EEtOH-Sp e no 14º dia após o tratamento. Ao término desse período os animais foram anestesiados, com a finalidade de ser coletado o sangue, através da via intracardíaca para a realização de exames hematológicos e bioquímicos visando avaliar a toxicidade renal e hepática. Depois da coleta de sangue os animais foram eutanasiados e seus órgãos (coração, fígado, baço e rins) pesados e examinados macroscopicamente. Os animais foram eutanasiados por overdose de anestesia, seguindo orientações da Resolução 1000/2012 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV), a qual dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais. Os animais foram anestesiados com cloridrato de quetamina 5% (anestésico) e cloridrato de xilazina 2 % (relaxante muscular), no intuito de diminuir a dor e o sofrimento.

Os parâmetros analisados foram: hemograma, ácido úrico, albumina, globulina, proteína total, amilase, colesterol total, HDL, creatinina, creatina quinase (CK-nac), fosfatase alcalina (FA), Gama GT (GGT), glicose, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), triglicerídeos e ureia. Para o hemograma o sangue foi acondicionado em tubos com EDTA e para as dosagens bioquímicas em tubos com gel separador. Os tubos com gel separador foram centrifugados por 10 min a 3000 rpm na macrocentrífuga (EV-LAB).

Os hemogramas foram realizados no equipamento ADVIA® 60 Hematology System (Bayer HealthCare LLC) e os parâmetros bioquímicos no equipamento Metrolab 2300 PLUS (Wiener lab.) pertencentes ao Laboratório de Análises Clínicas (LAC) da UEPB.

4.1.5 Avaliação da Atividade Antimicrobiana

4.1.5.1 Micro-organismos

Para o estudo da avaliação da atividade antimicrobiana foram utilizadas cepas provenientes da American Type Culture Collection (ATCC): *Staphylococcus aureus* ATCC (25923), *Escherichia coli* ATCC (25922), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC (27853), *Salmonella choleraesuis* ATCC (10708), *Candida albicans* ATCC, *Candida glabrata* ATCC e *Candida tropicalis* ATCC recomendadas para testes de suscetibilidade aos antimicrobianos (CLSI, 2009).

4.1.5.2 Meios de Cultura

Para garantir a viabilidade do microrganismo em estoque foi utilizado o Caldo de enriquecimento BHI (Brain Heart Infusion/ DIFCO®). Para o cultivo foi utilizado o meio Ágar Muller-Hinton (DIFCO®) e Ágar Sabourand Dextrose.

4.1.5.3 Preparação do Inócuo

Após o enriquecimento em Caldo BHI, uma alíquota de cada crescimento foi semeada através da técnica de esgotamento, por estrias, em ágar Muller Hinton e incubado a 37°C por 24 horas para as cepas bacterianas. Para as cepas leveduriformes foi realizada a mesma técnica, utilizando Agar Sabourand Dextrose e incubada a 35°C por 24 horas, permitindo dessa forma que o microrganismo estivesse em crescimento exponencial, o que garante segurança maior durante a realização da análise. Após esse período de incubação, algumas colônias foram diluídas em solução salina estéril 0,85% até atingirem a turbidez correspondente ao tubo 0,5 da escala de Mac-Farland, originando uma suspensão bacteriana padrão (CLSI, 2009).

4.1.5.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da concentração inibitória mínima foi realizada utilizando-se o EEtOH-Sp e a FaDCM-Sp. Os ensaios foram realizados por meio da técnica de microdiluição em caldo, utilizando placas de 96 orifícios estéreis e com tampa (ELOFF, 1998; NCUBE, FINNIE e VAN STADEN, 2012).

Em cada orifício da placa, foi adicionado 100 µL do meio líquido ágar Muller Hinton, para bactérias e caldo Sabouraud dextrose (CSD) duplamente concentrado, para fungos. Em seguida, 100 µL do EEtOH-Sp ou FaDCM-Sp na concentração inicial de 2048 µg/mL (também duplamente concentrado), foram dispensados nas cavidades da primeira linha da placa. E por meio de uma diluição seriada em razão de dois, foram obtidas as concentrações de 1024, 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8 e 4 µg/mL, de modo que na primeira linha da placa encontrava-se a maior concentração e na última, a menor concentração. Por fim foi adicionado 10 µL do inóculo com aproximadamente $1,5 \times 10^6$ UFC/mL das espécies bacteriana e fúngicas nas cavidades, onde cada coluna da placa correspondeu a uma cepa bacteriana ou fúngica, especificamente.

Para verificar a ausência de interferência nos resultados pelo solvente, salina 0,9%, utilizado na preparação do EEtOH-Sp e a FaDCM-Sp, foi feito um controle. Na cavidade controle foi colocado 100 µL do CSD duplamente concentrado, salina 0.9% e 10 µL da suspensão bacteriana ou fúngica. Para o controle do microrganismo foi colocado na cavidade 100 µL do CSD duplamente concentrado, 100 µL de água destilada estéril e 10 µL do inóculo de cada espécie. Também foi realizado um controle de esterilidade do meio, no qual foi colocado 200 µL do CSD em uma cavidade, na ausência da suspensão das bactérias ou fungos.

As placas foram assepticamente fechadas e incubadas entre 35-37 °C, por 24 horas, sem anaerobiose, para realização da leitura, utilizando-se o corante resazurina. As CIMs para o EEtOH-Sp e FaDCM-Sp foram definidas como a menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento bacteriano ou fúngico verificado nas cavidades quando comparado com o crescimento controle. Os experimentos foram realizados em duplicata.

4.1.6 Determinação da Motilidade Gastrintestinal

4.1.6.1 Amostras utilizadas na motilidade gastrintestinal

Para a realização dos protocolos experimentais, foram utilizadas as seguintes amostras: ketamina 5% (Vetanarcol), xilazina 2 % (Dorcipec), loperamida 2mg (Imosec®, Janssen Cilag), Cloridrato de metoclopramida 10mg (Plasil®, Sanofi Aventis), Vermelho de Fenol 0,05% em Carboximetilcelulose 1,5% (VFC), extrato etanólico e fase obtidos das folhas de *S. purpurea*.

4.1.6.2 Diarreia Induzida por Óleo de Rícino

Foram utilizados ratos *Wistar*, em jejum de 12 horas (com acesso a água *ad libitum*), uma hora antes do início do experimento a água foi retirada e os animais foram pesados, subdivididos em grupos (n = 5-6) e tratados com solução salina 0,9 % (10 mL/kg) (controle negativo), loperamida (10 mg/kg), EEtOH-Sp (125, 250 ou 500 mg/kg) ou FaDCM-Sp (125, 250 ou 500 mg/kg). Após 1 hora, foi administrado 0,7 mL de óleo de rícino por animal por via oral para induzir a diarreia (AWOUTERS et al, 1978). Os animais foram colocados em caixas individuais forradas com papel kraft. Após a administração do agente indutor da diarreia, foi realizada a contagem do número de bolos fecais e observado a sua consistência, por até 4 horas, classificando-os de acordo com a consistência em líquidos, semisólidos ou sólidos. Foram então determinados a quantidade de fezes líquidas, a quantidade de fezes totais, o tempo de início da diarreia e a porcentagem de inibição da diarreia. O índice de evacuação (IE) foi calculado, através da fórmula:

$$IE = [N^{\circ} \text{ de fezes sólidas} \times 1] + [N^{\circ} \text{ de fezes semissólidas} \times 2] + [N^{\circ} \text{ de fezes líquidas} \times 3]$$

Após 4 horas de observação os animais foram anestesiados para coleta de sangue através de punção intracardíaca, com a finalidade de se realizar o ionograma (sódio, potássio, cloro e íon bicarbonato) e dosagem da Proteína C Reativa ultrasensível. Depois da coleta de sangue os animais foram eutanasiados

por overdose de anestesia. O intestino foi retirado e coletado um fragmento do íleo para avaliação histológica em microscopia óptica.

Os ionogramas foram realizados no equipamento AVL 9180 Eletrodo Seletivo, em um laboratório tercerizado e a dosagem da Proteína C Reativa ultrasensível (Teste turbidimétrico BioClin/QUIBASA) no equipamento Metrolab 2300 PLUS (Wiener lab), pertencente ao Laboratório de Análises Clínicas (LAC) da UEPB.

4.1.6.3 Histologia do Íleo na Diarreia Induzida por Óleo de Rícino

Os fragmentos de íleo coletados durante o experimento de diarreia induzida por óleo de rícino, da FaDCM-Sp, foram fixados em solução de Bouin durante 8 horas. As secções do íleo foram desidratadas com etanol, passado através de xileno, e embutidos em paraplast. As secções de 4 µm de espessura foram obtidas usando o micrótomo (Leica RM 2125RT) e coradas com hematoxilina/eosina (HE) para observação histológica através da microscopia óptica.

4.1.6.4 Esvaziamento Gástrico

Ratos *Wistar* machos foram submetidos a jejum de 12 horas, posteriormente, pesados e divididos em grupos (n= 5 – 6). O grupo controle, tempo zero, e o controle negativo foram tratados com 10 mL/kg de solução salina 0,9 %. O grupo controle positivo com 30 mg/kg de cloridrato de metoclopramida. E os demais grupos com EEtOH-Sp (125; 250 e 500 mg/kg) ou FaDCM-Sp (125; 250 e 500 mg/kg). Transcorrido 1 hora do tratamento, 0,4 mL de suspensão de vermelho de fenol a 0,05% em carboximetilclulose 1,5 % (marcador colorimétrico) foi administrado ao grupo controle tempo zero. Logo depois os animais foram eutanasiados por overdose anestésica. Os demais grupos foram eutanasiados, após 30 minutos da administração do respectivo marcador. A cavidade abdominal foi aberta para retirada cuidadosa do estômago, fazendo-se necessária a ligadura dos esfíncteres pilórico e esofágico inferior, evitando perda de conteúdo estomacal. O conteúdo gástrico foi coletado em tubos Falcon, solubilizado em 7 mL de água destilada e centrifugado a 3000 rpm por 15 min. Em seguida, 1 mL do sobrenadante foi misturado com 1 mL de NaOH 0,025 mol/L e agitado com auxílio de um vórtex. Desse material, 1 mL foi

pipetado em duplicata para a cubeta do Espectrofotômetro (Shimatzu Modelo UV Mini 1240) e a leitura foi realizada em comprimento de onda de 570 nm. (SCARPIGNATO et al, 1980).

Os resultados foram expressos em porcentagem de esvaziamento gástrico em relação ao grupo controle tempo zero, de acordo com a equação:

$$\text{Porcentagem de Esvaziamento Gástrico} = 100 - \left[\frac{\text{Média da absorbância da amostra}}{\text{Média da absorbância Tempo 0}} \right]$$

4.1.6.5 Trânsito Intestinal

Nesse ensaio também foram utilizados, ratos *Wistar* machos (n = 5 - 6), os quais foram submetidos a jejum de 12 horas. Posteriormente, foram pesados e tratados oralmente com 10 mL/kg de solução salina 0,9 % (veículo), cloridrato de metoclopramida (30 mg/kg; controle positivo) e o EEtOH-Sp (125; 250 e 500 mg/kg) ou FaDCM-Sp (125; 250 e 500 mg/kg). Após 60 minutos dos tratamentos, foi administrado 10 mL/kg por via oral do marcador colorimétrico vermelho de fenol 0,05% em Carboximetilcelulose 1,5% (VFC). Após 30 minutos, os animais foram eutanasiados por overdose anestésica, para remoção do intestino delgado que foi ligado com fio de sutura algodão, no piloro e na junção íleo-cecal. Com auxílio de uma fita métrica, o comprimento total do intestino delgado (piloro à válvula íleo-cecal) e a distância percorrida pelo vermelho de fenol (última porção que contenha pelo menos 1 cm contínuo do marcador) foram medidos para cálculo do percentual do percurso do marcador, em função do comprimento total do intestino (STICKNEY; NORTHUP, 1959).

Os resultados foram expressos em percentual de inibição da distância percorrida pelo marcador em relação ao comprimento total do intestino delgado do grupo experimental em relação ao grupo, controle de acordo com a equação:

$$\text{Porcentagem de Trânsito} = \frac{\text{Comprimento percorrido pelo vermelho de fenol}}{\text{Comprimento total do intestino}} \times 100$$

4.1.6 Comitê de Ética

Para a realização deste trabalho, todos os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA do Centro de Ensino Superior e Desenvolvimento (CESED/FACISA) com o registro nº 0020/16102012 (Anexo 2).

4.1.7 Análise Estatística

Para os resultados obtidos a partir dos ensaios de toxicidade aguda foi realizado o teste “t” de Student e Mann-Whitney. A concentração letal média (CL50) foi determinada pelo método Probitos, utilizando software STATPLUS® 2009, com 95% de intervalo de confiança. Já para os resultados farmacológicos obtidos em ensaios de indução de determinação da motilidade intestinal, utilizou-se a análise de variância de uma via (ANOVA), seguido por pós-teste (Dunnett’s e/ou Tukey’s). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (d.p.) e o nível de significância mínimo foi de $p < 0,05$, utilizando o software, GraphPad Prisma 5.0.



Resultados

5. RESULTADOS

5.1 Prospecção Fitoquímica

Após a determinação fitoquímica dos flavonóides, a qual foi obtida a partir da curva padrão gerada pela quercetina os resultados mostraram que o EEtOH-Sp apresentou em sua composição química aproximadamente 6.7 % de flavonóides. Enquanto que os polifenóis 3.17 % de polifenóis totais, como mostrado na tabela 2.

Tabela 2- Quantificação de polifenóis e flavonóides totais no EEtOH-Sp

Amostra vegetal	Flavonóides (µg/ml)	Flavonóides (%)	Polifenóis (µg/ml)	Polifenóis (%)
EEtOH-Sp	8,83	6,71	16,51	3,17

5.2 Ensaios Toxicológicos de *Spondias purpurea* L.

5.2.1 Determinação da Concentração Letal 50% (CL50%) frente à *Artemia salina*

O ensaio de letalidade com *Artemia salina* (Leach) foi utilizado para avaliar a toxicidade do extrato etanólico e da fase diclorometano de *S. purpurea* L., utilizando a CL50% como parâmetro da atividade biológica.

A tabela 3 apresenta os resultados encontrados, os quais sugerem que ambos possuem substâncias bioativas e baixa toxicidade.

Tabela 3 - Valores da Concentração Letal 50% do EEtOH-Sp e da FaDCM-Sp frente a *Artemia salina*

AMOSTRA VEGETAL	CL 50% (µg/mL)±Desvio-padrão
EEtOH-Sp	2300.67±196.66
FaDCM-Sp	1106.17±102.24

Os resultados foram submetidos à análise Probitos, utilizando o software Statplus ® 2009, com 95% de intervalo de confiança.

5.2.2 Ensaio Toxicológico Pré-clínico Agudo

Considerando-se os parâmetros citados por Almeida et al. (1999), foi observado que o EEtOH-Sp administrado apenas induziu irritabilidade nas fêmeas, sendo que esses sinais foram revertidos na 2ª hora após a administração do referido extrato, quando comparado ao respectivo grupo controle (solução salina 0,9%).

Ao ser avaliado o consumo de ração e à ingesta de água foi observado que o extrato não promoveu alteração significativa no consumo de ração em comparação com o grupo controle. Assim, na avaliação ponderal não foi observado aumento no peso dos animais ao término do ensaio agudo, o que corrobora com o resultado citado acima. Em relação ao peso e características macroscópicas dos órgãos os animais que receberam o EEtOH-Sp foi observado que também não houve alterações, quando comparado ao grupo controle (Tabela 4).

O EEtOH-Sp não causou mortes aos animais durante os 14 dias de observação após a administração, impossibilitando a determinação da DL50.

Tabela 4 - Efeito da administração oral do EEtOH-Sp obtido das folhas de *Spondias purpurea* L. no consumo de ração e água, evolução ponderal e peso dos órgãos por ratos Wistar machos e fêmeas, durante 14 dias

PARÂMETROS	SEXO	TRATAMENTOS	
		CONTROLE (Salina 0,9%)	EEtOH-Sp (2000mg/Kg)
Consumo de Ração (g)	Fêmeas	130,80±2,16	132,00±2,87
	Machos	98,36±3,94	86,36±4,46
Consumo de água (mL)	Fêmeas	209,20±8,55	240,30±15,30
	Machos	173,30±8,79	150,90±6,54
Avaliação Ponderal (g)	Fêmeas		
	Inicial	168,90±4,46	135,60±9,88
	Final	204,40±1,30	180,4±6,59
	Machos		
	Inicial	154,60±5,22	155,20±2,58
	Final	243,00±8,51	196,00±4,63
Peso de Órgãos (mg/g)	Fêmeas		
	Fígado	0,032±0,0010	0,034±0,0020
	Coração	4,361±0,1243	4,439±0,1148
	Rins	0,0072±0,0002	0,0081±0,0004
	Baço	0,0041±0,0002	0,0041±0,0003
	Machos		
	Fígado	0,043±0,0036	0,045±0,0032
	Coração	4,531±0,0883	4,766±0,0531
Rins	0,0093±0,0006	0,0100±0,0006	
Baço	0,0051±0,0001	0,0050±0,0001	

Os resultados estão expressos como média ± d.p. (n=7). Teste t student, comparados a salina 0,9%. Para o índice de órgãos, os valores estão expressos como média ± d.p. da divisão do peso dos órgãos (mg) pelo peso dos animais (g); teste "t" de Student p>0,05

A análise do perfil hematológico, do sangue coletado dos animais após 14 dias de observação não mostrou significância estatística que apontasse toxicidade. Apenas observou-se uma discreta alteração na Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM), que é a relação entre o valor da hemoglobina contida num determinado volume de sangue e o hematócrito, sendo expressa em porcentagem, porém essa discreta alteração não é relevante para inferir toxicidade (Tabela 5).

Tabela 5 - Efeito da administração oral do EEtOH-Sp obtido das folhas de *Spondias purpurea* L. nos parâmetros hematológicos de ratos Wistar machos e fêmeas, durante 14 dias

PARÂMETROS	FÊMEAS Controle Negativo	FÊMEAS EEtOH-Sp	MACHOS Controle Negativo	MACHOS EEtOH-Sp
Hemácias (milhões/mm ³)	7,13 ± 0,10	6,88 ± 0,12	6,41 ± 0,18	6,08 ± 0,33
Hemoglobina (g%)	13,30 ± 0,37	12,99 ± 0,24	12,33 ± 0,20	11,72 ± 0,50
Hematócrito (%)	41,40 ± 0,81	42,39 ± 0,88	43,60 ± 1,14	42,53 ± 0,91
VCM (u ³)	57,46 ± 0,72	61,61 ± 1,53	66,62 ± 2,06	66,04 ± 1,50
HCM (uug)	18,54 ± 0,22	18,79 ± 0,20	19,50 ± 0,33	20,18 ± 0,86
CHCM (g%)	32,26 ± 0,33	30,57 ± 0,85*	28,57 ± 0,40	26,65 ± 1,57*
Leucócitos (10 ³ /mm ³)	7,74 ± 1,20	7,44 ± 2,35	6,31 ± 0,48	4,70 ± 0,78
Segmentado (%)	19,14 ± 3,98	8,91 ± 1,72	7,95 ± 0,43	7,00 ± 0,36
Eosinófilo (%)	1,71 ± 0,28	1,14 ± 0,14	2,33 ± 0,21	1,83 ± 0,30
Linfócito (%)	75,57 ± 2,49	82,29 ± 3,65	83,00 ± 0,68	85,67 ± 0,95
Monócito (%)	6,42 ± 0,36	5,14 ± 0,50	5,83 ± 0,94	5,50 ± 0,80
Plaquetas (10 ³ /mm ³)	801,00 ± 30,31	891,00 ± 52,32	910,20 ± 91,99	575,00 ± 106,10

Os resultados estão expressos como média ± d.p (n=6-7). Para a avaliação dos parâmetros hematológicos, os valores estão expressos como média ± d.p., teste "t" de Student *p<0,05, comparados à salina 0,9%

A tabela 6 apresenta os valores séricos dos parâmetros bioquímicos, dosados após o tratamento dos animais com EEtOH-Sp e comparados com animais tratados com salina. A dosagem destes parâmetros se propôs principalmente verificar a toxicidade hepática e renal e ao analisar os dados pode-se observar que estes parâmetros não apresentaram alteração com significância estatística que apontasse toxicidade nos diversos órgãos e sistemas avaliados, tampouco apresentaram sinais de toxicidade.

Tabela 6 - Efeito da administração oral do EEtOH-Sp obtido das folhas de *S. purpurea* L. nos parâmetros bioquímicos de ratos Wistar machos e fêmeas, durante 14 dias

PARÂMETROS	FÊMEAS Controle Negativo	FÊMEAS EEtOH-Sp	MACHOS Controle Negativo	MACHOS EEtOH-Sp
Ácido úrico (mg/dL)	1,58 ± 0,26	1,75 ± 0,34	2,83 ± 0,60	2,66 ± 0,66
Proteínas totais (mg/dL)	6,07 ± 0,23	5,18 ± 0,25	4,31 ± 0,43	4,45 ± 0,27
Colesterol total (mg/dL)	63,86 ± 4,16	66,43 ± 3,92	71,83 ± 7,00	72,67 ± 1,11
Creatinina (mg/dL)	0,37 ± 0,04	0,27 ± 0,04	0,38 ± 0,09	0,20 ± 0,05
Fosfatase alcalina (mg/dL)	53,00 ± 3,71	67,00 ± 8,47	62,33 ± 10,23	127,80 ± 21,39
Gama GT (mg/dL)	4,28 ± 0,64	5,71 ± 1,26	7,83 ± 1,35	5,83 ± 0,79
Glicose (mg/dL)	118,60 ± 11,72	123,30 ± 24,64	88,00 ± 14,57	90,33 ± 8,33
HDL (mg/dL)	16,86 ± 0,85	17,43 ± 0,94	15,33 ± 2,02	16,67 ± 1,14
AST (mg/dL)	161,60 ± 32,25	223,90 ± 55,60	386,30 ± 65,65	482,30 ± 88,75
ALT (mg/dL)	70,43 ± 4,02	71,29 ± 8,97	90,50 ± 5,11	104,00 ± 12,81
Triglicerídeos (mg/dL)	34,50 ± 4,12	27,17 ± 3,07	72,17 ± 10,40	57,50 ± 10,19
Uréia (mg/dL)	50,43 ± 3,31	41,43 ± 4,07	55,83 ± 1,07	44,50 ± 1,89

Os resultados estão expressos como média ± d.p (n=6-7). Teste t student, *p<0,05, comparados a salina 0,9%. Para a avaliação dos parâmetros bioquímicos, os valores estão expressos como média ± d.p., teste "t" de Student *p>0,05

5.3 Avaliação da Atividade Antimicrobiana

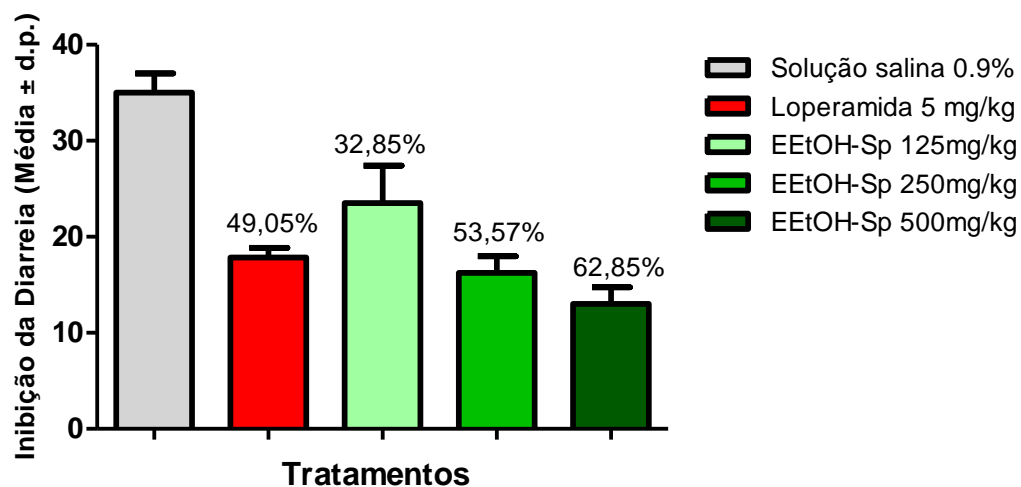
Após a realização do ensaio de microdiluição, observa-se que houve crescimento bacteriano e fúngico nos poços que havia as amostras testadas, nas concentrações de 1024, 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8 e 4 µg/mL, indicando então que nestas concentrações tanto o EEtOH-Sp quanto a FaDCM-Sp não apresentaram atividade antimicrobiana para os microrganismos testados, nas concentrações testadas.

5.4 Determinação da Motilidade Gastrintestinal

5.4.1 Diarreia Induzida por Óleo de Rícino

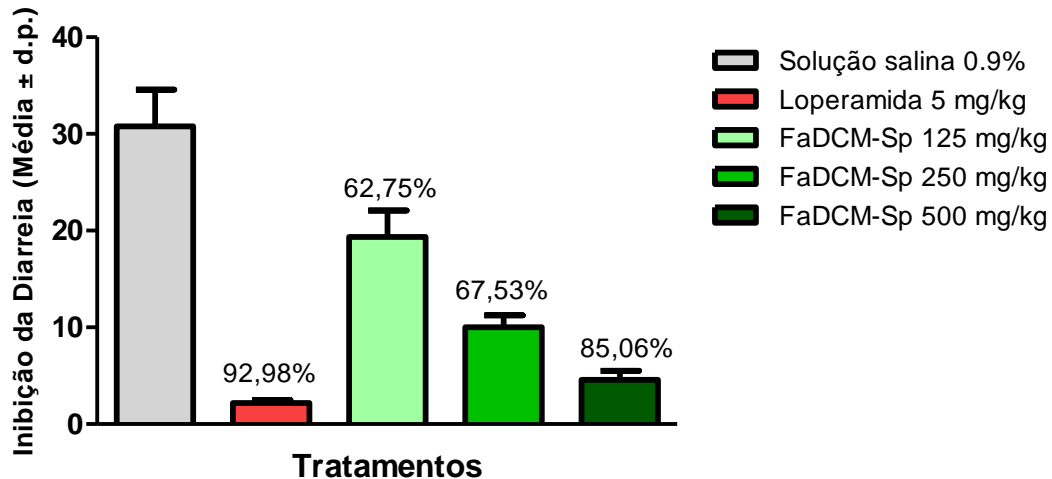
No modelo de diarreia induzida por óleo de rícino em ratos, os resultados da administração do EEtOH-Sp ou loperamida mostram que houve inibição de diarreia em todas as doses testadas com maior eficiência na dose de 500mg/Kg que apresentou 62,85%, quando comparados ao controle negativo. Já os resultados da administração do FaDCM-Sp mostram que houve 85,06% de inibição na dose de 500 mg/Kg (Figuras 8 e 9).

Figura 8 - Efeito da administração oral do EEtOH-Sp e da loperamida na diarreia induzida por óleo de rícino em ratos



Os resultados estão expressos como média \pm d.p. Análise de variância de uma via (ANOVA): $F_{(4,25)} = 14.50$, seguido do pós-teste de Dunnett, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ ($n=5-6$)

Figura 9 - Efeito da administração oral do FaDCM-Sp e da loperamida na diarreia induzida por óleo de rícino em ratos



Os resultados estão expressos como média \pm d.p. Análise de variância de uma via (ANOVA): $F_{(4,27)} = 29$, seguido do pós-teste de Dunnett ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ ($n = 5-6$)

O EEtOH-Sp inibiu também o número de fezes líquidas, quando comparado ao controle negativo. A loperamida apresentou 66,70 % e o EEtOH-Sp apresentou para as doses de 125, 250 e 500 mg/Kg os valores 41,18 %, 67,25 % e 85,29 % respectivamente. Esse resultado mostra a atuação eficaz do EEtOH-Sp, em relação a redução do número de fezes líquidas. Para a FaDCM-Sp os resultados foram semelhantes em relação a inibição de fezes líquidas, quando comparado ao controle negativo, a loperamida apresentou 73,98% e a FaDCM-Sp apresentou para as doses de 125, 250 e 500 mg/Kg, os seguintes valores: 47,80 %, 68,65 % e 71,32 % respectivamente.

Em relação ao número total de fezes tanto o EEtOH-Sp quanto a FaDCM-Sp apresentaram comportamento semelhante, reduziram o número total de fezes quando comparados ao controle negativo e prolongaram o tempo do início da diarreia (Tabela 7).

Tabela 7 - Efeito da administração oral do EEtOH-Sp, da FaDCM-Sp e loperamida na diarreia induzida por óleo de rícino em ratos

TRATAMENTO	DOSE (mg/kg)	% de INIBIÇÃO DE FEZES LÍQUIDAS	FEZES LÍQUIDAS (MÉDIA ± d.p.)	FEZES TOTAIS (MÉDIA ± d.p.)	TEMPO DE INÍCIO DA DIARREIA (min)
Solução					
salina 0,9%			8,50 ± 2,69	14,50 ± 1,50	45,00 ± 16,46
Loperamida	5	66,70	2,83 ± 0,98 ***	8,50 ± 0,86 ***	171,80 ± 7,52***
EEtOH-Sp	125	41,18	5,00 ± 1,58 **	10,25 ± 3,26 **	140,00 ± 61,97**
	250	67,25	2,75 ± 1,09 ***	8,00 ± 1,41 ***	165,00 ± 65,04***
	500	85,29	1,25 ± 0,43 ***	5,75 ± 1,63 ***	211,70 ± 46,22***
Solução					
salina 0,9%			6,38 ± 3,25	10,17 ± 4,49	63,33 ± 8,75
Loperamida	5	73,98	1,66 ± 0,81 ***	2,00 ± 0,89 ***	215,00 ± 10,49***
FaDCM-Sp	125	47,80	3,33 ± 1,63 **	5,16 ± 1,72 **	113,30 ± 43,67**
	250	68,65	2,00 ± 0,89 ***	4,36 ± 1,75 ***	130,00 ± 24,49***
	500	71,32	1,83 ± 0,75 ***	3,16 ± 1,16 ***	259,20 ± 14,97***

Os resultados estão expressos como média ± d.p. Análise de variância de uma via (ANOVA): $F_{(4,25)} = 17.03$; $F_{(4,24)} = 14.57$; $F_{(4,29)} = 11.08$ (n=5-6) para o EEtOH e $F_{(4,29)} = 9.263$; $F_{(4,29)} = 10.45$; $F_{(4,29)} = 64.57$ (n=5-6) para a FaDCM; seguido do pós-teste de Dunnett, comparado ao controle negativo (Solução salina 0.9 %), **p<0,01, ***p<0,001.

Estes resultados mostram que tanto o extrato etanólico quanto a fase diclorometano de *S. purpurea*, produziram efeito antidiarreico em ratos, reduzindo o número de fezes líquidas e o número de fezes totais.

Foi quantificada, a PCR-ultrassensível, a qual é destaque entre as proteínas de fase aguda da inflamação. Os valores dosados para os animais tratados com o EEtOH-Sp ou FaDCM-Sp mostraram uma alteração estatisticamente relevante, quando comparados ao grupo salina, indicando que o extrato e a fase diclorometano de *S. purpurea* podem ter reduzido os níveis de inflamação aguda, já que os níveis de PCR-ultrassensível apresentaram-se mais baixos (Tabela 8).

Tabela 8 - Perfil do PCR-ultrassensível em modelo de diarreia induzida por óleo de Rícino em ratos tratados oralmente com salina 0,9%, EEtOH-Sp, FaDCM-Sp e Loperamida

TRATAMENTO	DOSE (mg/kg)	PCR ultrassensível (mg/dL)
Solução salina 0,9%		1,05 ± 0,21
Loperamida	5	0,23 ± 0,10
EEtOH-Sp	125	0,39 ± 0,14***
	250	0,33 ± 0,11***
	500	0,18 ± 0,07***
Solução salina 0,9%		0,81 ± 0,26
Loperamida		0,41 ± 0,17
FaDCM-Sp	125	0,40 ± 0,16 **
	250	0,31 ± 0,11***
	500	0,11 ± 0,08***

Os resultados estão expressos como média ± d.p. Análise de variância de uma via (ANOVA): $F_{(4,29)} = 37.17$ (n=5-6) para o EEtOH e $F_{(4,29)} = 10.89$ (n=5-6) para a FaDCM; seguido do pós-teste de Dunnett, comparado ao controle negativo (Solução salina 0,9 %), **p<0,01, ***p<0,001.

O perfil dos íons Na^+ , potássio (K^+), Cl^- e HCO_3^- dos animais tratados com loperamida, EEtOH-Sp ou FaDCM-Sp, estão apresentados na tabela 9. Foi observado que houve uma diminuição da perda de íons estatisticamente significativa nos valores encontrados para a loperamida, EEtOH-Sp e FaDCM-Sp, quando comparados aos valores obtidos pelo grupo controle tratado com salina. Neste grupo, houve uma maior perda de íons em razão da diarreia secretória, nos outros grupos: loperamida 5mg, EEtOH-Sp 125, 250 e 500 mg/Kg e FaDCM-SP 250 e 500 mg/Kg; houve uma redução da perda dos íons Na^+ , K^+ , Cl^- e HCO_3^- . A dose de 125 mg/Kg da FaDCM-Sp mostrou eficiência quanto à diminuição da perda apenas do íon HCO_3^- .

É importante ressaltar que o extrato, a fase e a loperamida foram diluídos em salina, logo, todos os grupos receberam salina, estando então os grupos equivalentes em relação à reposição de Na^+ e Cl^- , que a salina proporciona.

Tabela 9 - Perfil do Ionograma em modelo de diarreia induzida por óleo de rícino em ratos tratados oralmente com salina 0,9%, EEtOH-Sp, FaDCM-Sp e Loperamida

TRATAMENTO	DOSE (mg/kg)	Na ⁺ (mEq/L)	K ⁺ (mEq/L)	Cl ⁻ (mEq/L)	HCO ₃ ⁻ (mEq/L)
Salina 0,9%		121,10 ± 2,11	3,38 ± 0,28	91,14 ± 7,17	7,50 ± 1,04
Loperamida	5	127,00 ± 3,21**	5,00 ± 0,33***	99,71 ± 1,97**	12,33 ± 1,86***
EEtOH-Sp	125	126,00 ± 3,10*	4,77 ± 0,27***	97,43 ± 2,82*	13,50 ± 1,64***
	250	128,10 ± 4,48**	4,64 ± 0,41***	98,86 ± 3,62**	13,50 ± 1,51***
	500	128,30 ± 2,87**	4,91 ± 0,50***	99,86 ± 2,11**	13,00 ± 0,89***
Salina 0,9%		125,30 ± 3,20	3,08 ± 0,36	95,67 ± 2,87	15,17 ± 2,31
Loperamida	5	140,50 ± 8,82***	4,91 ± 0,77***	99,17 ± 1,16*	27,67 ± 3,32***
FaDCM-Sp	125	130,20 ± 3,43	4,06 ± 0,37	99,00 ± 1,78	25,67 ± 1,86***
	250	137,20 ± 3,54**	5,35 ± 1,25***	99,50 ± 2,66*	24,17 ± 2,13***
	500	144,30 ± 2,42***	4,73 ± 0,56**	103,30 ± 2,25***	21,17 ± 2,78**

Os resultados estão expressos como média ± d.p. Análise de variância de uma via (ANOVA): $F_{(4,34)} = 5.685$; $F_{(4,34)} = 21.91$; $F_{(4,34)} = 5.693$ e $F_{(4,29)} = 18.71$ ($n=5-6$) para o sódio; potássio; cloro e íon bicarbonato do EEtOH respectivamente e $F_{(4,29)} = 15.06$; $F_{(4,29)} = 8.469$; $F_{(4,29)} = 6.723$ e $F_{(4,29)} = 22.03$ ($n=5-6$) para o sódio; potássio; cloro e íon bicarbonato do (n=5-6) para da FaDCM respectivamente; seguido do pós-teste de Dunnett, comparado ao controle negativo (Solução salina 0.9 %), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

5.4.2 Histologia do Íleo na Diarreia Induzida por Óleo de Rícino

O estudo histopatológico confirmou que o pré-tratamento com a FaDCM-Sp minimiza o dano histológico no tecido íleo, causado pela diarreia. No grupo de solução salina 0,9% (Controle negativo), a administração de óleo de rícino induziu uma perturbação da região superficial das glândulas intestinais com fugas de fluido, espaços subepiteliais e infiltração de células inflamatórias, além do crescimento dos gânglios linfáticos e lesão submucosa (Figuras 10 A-B, setas). Em comparação com a droga de referência, loperamida (Figuras 10 C-D), o tratamento oral com 125 mg/kg (Figuras 11 E-F), 250 mg/kg (Figuras 11 G-H) e 500 mg/kg (Figura 11 I-J) da FaDCM-Sp foi também eficaz na reparação do tecido, reduzindo os danos.

Figura 10 - Cortes histológicos do íleo de Ratos Wistar submetidos à diarreia induzida por óleo de Rícino. (A-B) Grupo Controle negativo – Salina 0,9% e (C-D) Grupo Controle positivo – Loperamida

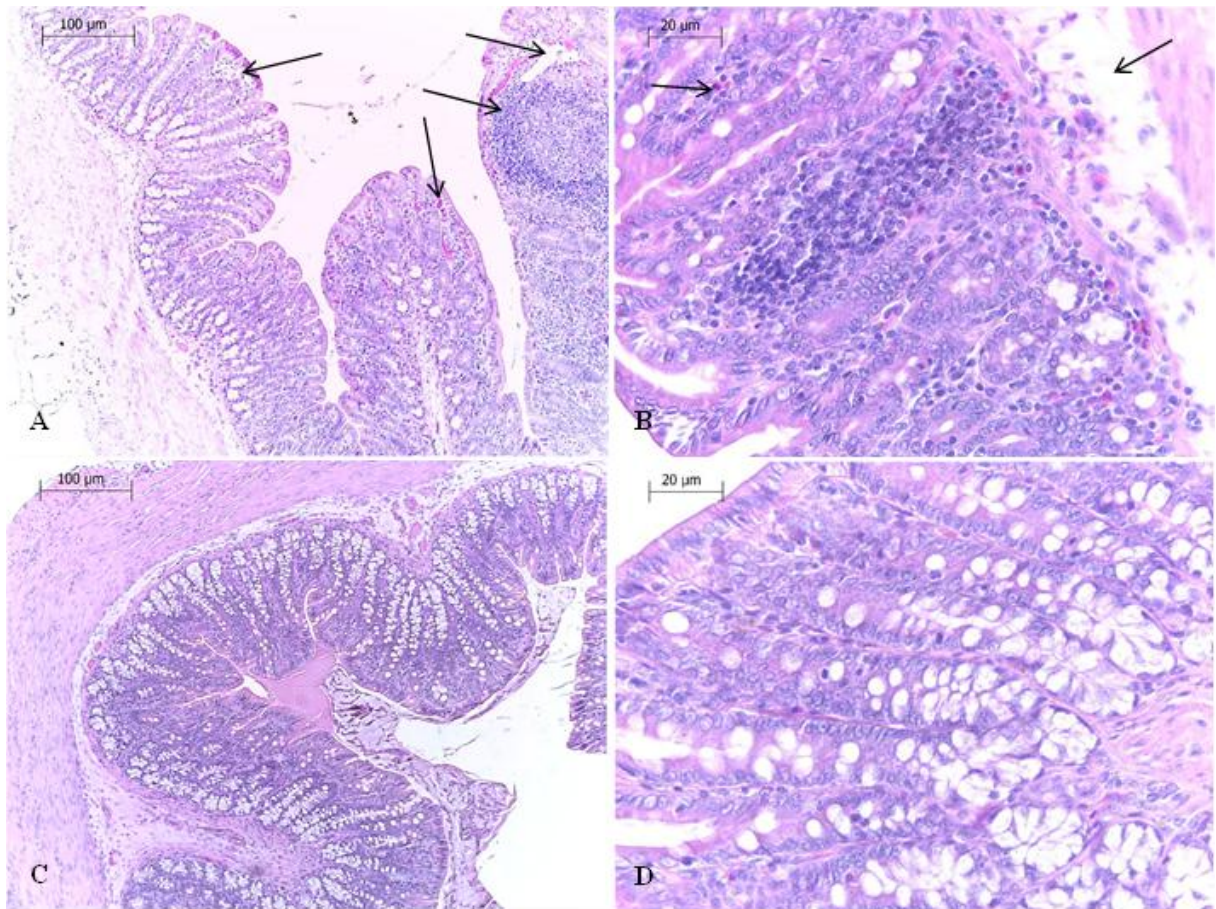
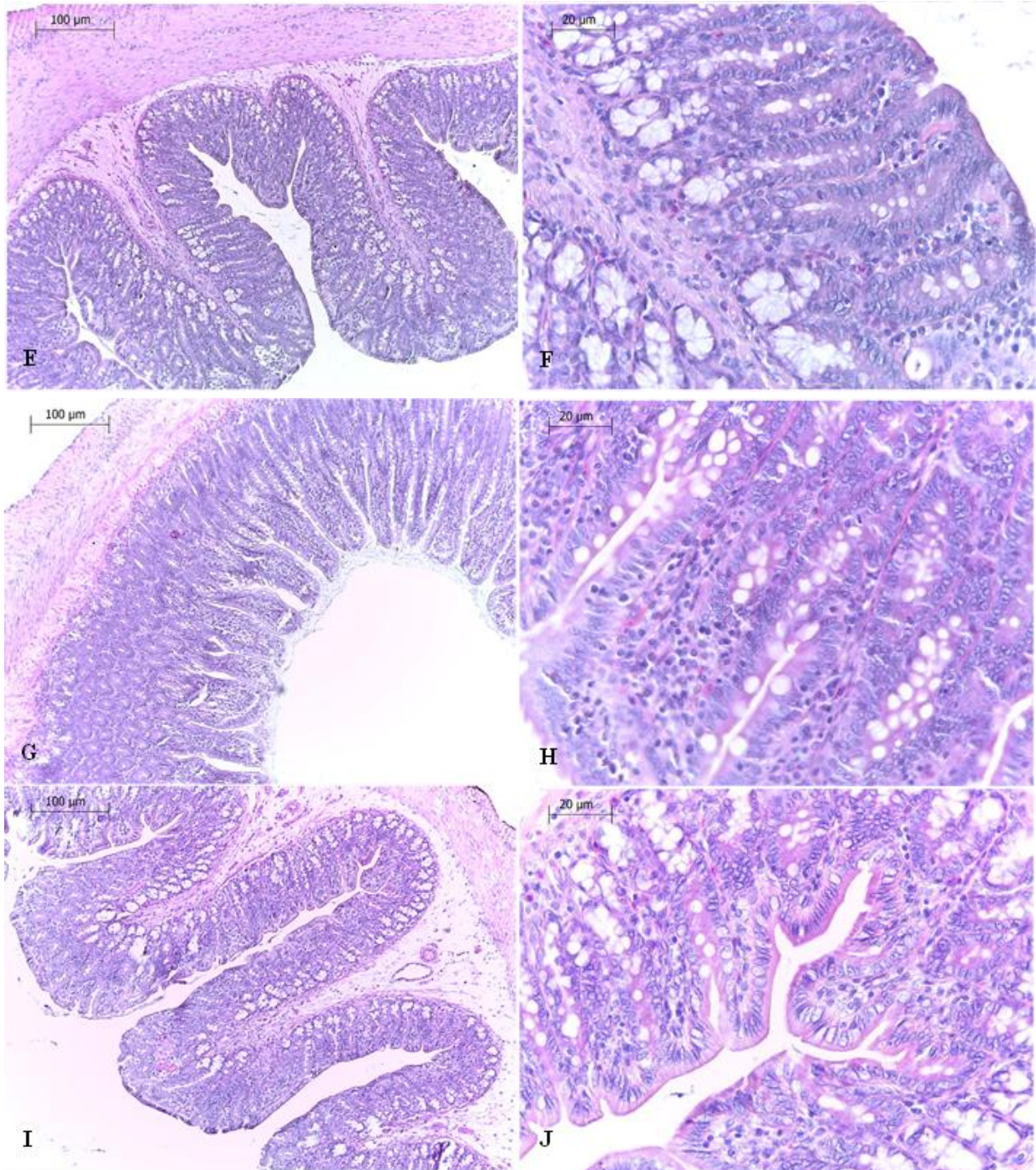


Figura 11 - Cortes histológicos do íleo de Ratos Wistar submetidos à diarreia induzida por óleo de Rícino. (E-F) Grupo pré-tratado com FaDCM-Sp 125 mg, (G-H) Grupo pré-tratado com FaDCM-Sp 250 mg, (I-J) Grupo pré-tratado com FaDCM-Sp 500 mg



5.4.3 Esvaziamento Gástrico

O modelo animal para a observação do efeito do EEtOH-Sp e FaDCM-Sp na motilidade gástrica, fundamentou-se na administração oral de um marcador colorido semi-sólido (VFC), para avaliar alterações no esvaziamento gástrico, considerando a quantidade do marcador que permaneceu no estômago durante um período de tempo. Como controle positivo foi utilizada a metoclopramida 30 mg/kg, um antagonista dopaminérgico que atua estimulando o esvaziamento gástrico. Os resultados obtidos mostraram que tanto o EEtOH-Sp quanto a FaDCM-Sp não apresentaram significância estatística para o esvaziamento gástrico quando comparados ao grupo controle negativo (Tabela 10).

Tabela 10 - Efeito da administração oral do EEtOH-Sp e FaDCM-Sp no esvaziamento gástrico em ratos

TRATAMENTO	DOSE (mg/kg)	Esvaziamento gástrico (%)
Solução salina 0,9%		31,20 ± 4,48
Metoclopramida	5	95,00 ± 2,44***
EEtOH-Sp	125	36,40 ± 6,46
	250	41,00 ± 7,64
	500	40,80 ± 7,53
FaDCM-Sp	125	36,20 ± 6,53
	250	39,40 ± 5,32
	500	39,60 ± 6,10

Os resultados estão expressos como média ± d.p. Análise de variância de uma via (ANOVA): $F_{(4,24)} = 92.13$ (n=5-6) para o EEtOH-Sp e $F_{(4,26)} = 127.15$ (n=5-6) para a FaDCM; seguido do pós-teste de Dunnett, comparado ao controle negativo (Solução salina 0.9 %), ***p<0,001.

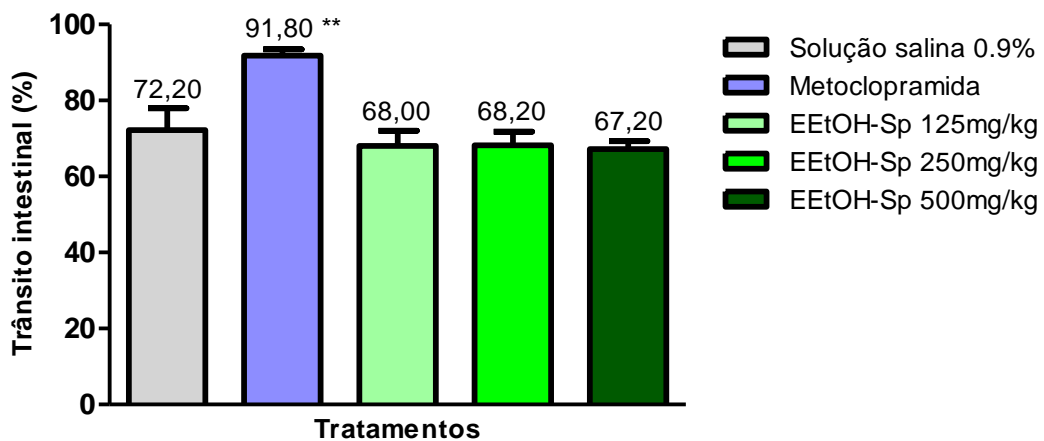
5.4.4 Trânsito Intestinal

No modelo de motilidade intestinal em ratos, os resultados da administração oral do EEtOH-Sp mostraram valores que variaram entre 67 e 68 %, do percentual da distância percorrida pelo VFC no intestino do rato, não apresentando diferença significativa em relação ao controle negativo. Já a metoclopramida 30 mg/Kg,

apresentou 91,80 % da distância percorrida pelo VFC mostrando diferença significativa em relação ao controle como esperado.

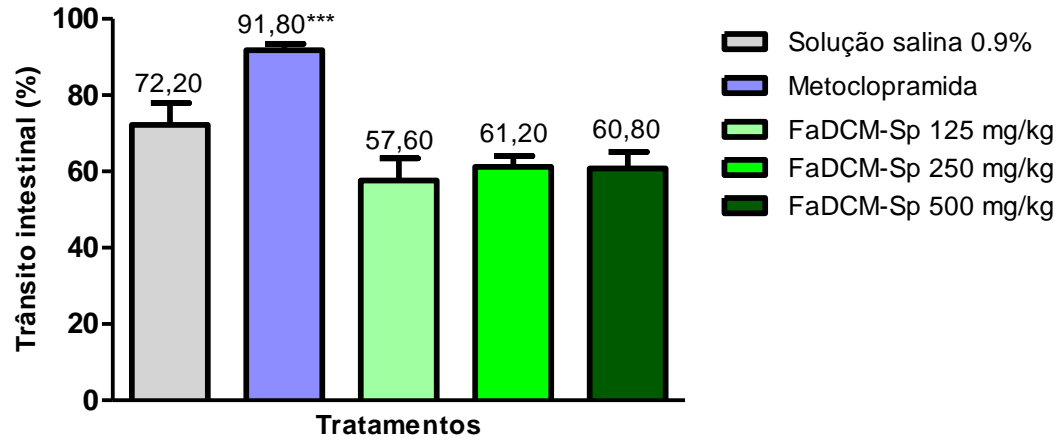
Para a FaDCM-Sp, os resultados flutuaram entre 57 e 61 %, do percentual de inibição da distância percorrida pelo VFC no intestino do rato. Estes resultados mostram que tanto o EEtOH-Sp quanto a FaDCM-Sp nas doses utilizadas não alteram o trânsito intestinal normal do rato (Figuras 12 e 13).

Figura 12 - Efeito da administração oral do EEtOH-Sp e metoclopramida no trânsito intestinal de ratos



Os resultados estão expressos como média \pm d.p. Análise de variância de uma via (ANOVA): $F_{(4,24)} = 7,878$ seguido do pós-teste de Dunnett ** $p < 0,01$ (n=5).

Figura 13 - Efeito da administração oral do FaDCM-Sp e metoclopramida no trânsito intestinal de ratos



Os resultados estão expressos como média \pm d.p. Análise de variância de uma via (ANOVA): $F_{(4,24)} = 10,19$ seguido do pós-teste de Dunnett *** $p < 0,001$ ($n=5$).



Discussão

6. DISCUSSÃO

Clinicamente a diarreia é uma consequência dos distúrbios da função intestinal na qual há uma secreção excessiva, absorção prejudicada e/ou rápido trânsito intestinal (TAFESSE e MEKONNEN, 2012). Neste trabalho avaliou-se a toxicidade aguda, a atividade antibacteriana e a atividade antidiarreica do extrato etanólico bruto (EEtOH-Sp) e de sua fase Diclorometano (FaDCM-Sp) obtidos das folha de *Spondias purpurea* L., estudando sua influencia no esvaziamento gástrico e no transito intestinal utilizando abordagens *in vitro* e *in vivo*.

Dentre os resultados da pesquisa foi relevante demonstrar pela primeira vez que *S. purpurea* apresenta atividade antidiarreica frente ao modelo que mimetiza a diarreia secretória no homem e que esta atividade está relacionada à diminuição da perda íons Na^+ e Cl^- , além da atividade anti-inflamatória demonstrada através da pesquisa da PCR, comprovando então a indicação popular.

O interesse na realização do trabalho surgiu devido ao grande impacto da diarreia sobre a mortalidade infantil. Segundo Huda et al. (2012), em 2008, cerca de 1,3 milhões de crianças menores de cinco anos de idade morreram em todo o mundo devido às doenças diarreicas. Esse número corresponde aproximadamente ao mesmo número de mortes por AIDS, incluindo todas as faixas etárias (BIRD et al, 2010). Nos países mais pobres, a diarreia é a terceira causa mais comum de morte em crianças nessa faixa etária (VICTORA, 2009). Dessa forma, a pesquisa se propôs a buscar a comprovação de um tratamento de fácil acesso e de baixo custo, já que é uma enfermidade que atinge principalmente pessoas com um potencial econômico mais baixo.

Para tal faz-se necessário o conhecimento das riquezas naturais e do conhecimento popular sobre o uso de plantas nativas de cada região para uso da população local. De acordo com Oliveira et al. (2010), em comunidades rurais da caatinga pernambucana, as folhas de *S. purpurea* tem indicação etnomedicinal para o tratamento de diarreia, distúrbios gastrintestinais e como antimicrobiana.

Contudo, a preservação da biodiversidade e a exploração racional das suas fontes naturais para benefício da humanidade contribuem para o desenvolvimento

sustentável de um país nas suas diversas áreas como educação, ciência, tecnologia e inovação, num cenário social e econômico que assegura a manutenção da saúde e a cura de doenças (BRAZ-FILHO, 2010).

Segundo Probst (2012), os compostos fenólicos estão presentes em todos os órgãos das plantas, já foram caracterizados mais de 8000 compostos que compreendem desde estruturas com moléculas simples, como os ácidos fenólicos, a compostos cujas moléculas são altamente ramificadas, como os taninos. Os polifenóis podem ser divididos em pelo menos 10 classes diferentes baseada em suas estruturas químicas (fenóis simples, ácidos fenólicos, benzoquinonas, isocumarinas e cumarinas, naftoquinonas, estilbenos, acetofenonas, xantonas, entre outros). Os flavonoides constituem a classe fenólica mais importante com mais de 5000 compostos descritos e podem ser originados basicamente por duas rotas bioquímicas diferentes, seja pela via do chiquimato ou pela via do acetato/malonato (MACHADO et al, 2008).

Os flavonóides representam um dos grupos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem vegetal e são amplamente distribuídos no reino vegetal. Têm ação anti-inflamatória por causar inibição de COX-2 e de óxido nítrico sintase. Podendo reduzir a ativação do sistema complemento, diminuindo a adesão de células inflamatórias ao endotélio, resultando em uma redução da resposta inflamatória (MACHADO et al, 2008). A determinação fitoquímica de polifenóis e flavonóides no extrato etanólico de *Spondias purpurea* sugere a presença desses compostos, o que pode justificar suas atividades biológicas.

De acordo com Amaral e colaboradores (2007), a toxicidade de plantas medicinais constitui hoje um problema sério de saúde pública, sendo um motivo crescente de inquietação nos meios científicos que envolvem estudos com plantas medicinais, pois tem sido comum a ocorrência de alterações e toxidez dos mesmos.

Para tanto, no início desta pesquisa se propôs a investigação de possíveis sinais de toxicidade de *Spondias purpurea* através de ensaios pré-clínicos, para posterior realização de estudos voltados à atividade antidiarreica. Pois, apesar das plantas possuírem muitos usos terapêuticos que são conhecidos popularmente pelas

pessoas, muitas vezes se desconhece o fato de que elas podem apresentar toxicidade.

Conforme Brito et al. (2012), a *Artemia salina* é um microcrustáceo muito utilizado na alimentação de peixes. É bastante empregada em ensaios toxicológicos, pois é de fácil manuseio, além disso, possui baixo custo, fácil cultivo e obtenção, sendo um método conveniente para a avaliação preliminar da toxicidade em aditivos alimentares e extratos vegetais (RAJEH et al, 2012).

A. salina possui similaridades com células de mamíferos uma vez que realiza metabolismo de purinas e possui DNA e RNA polimerase (AJAIYEGBA et al, 2006). Segundo Meyer et al.(1982), na avaliação da toxicidade de produtos naturais usando este bioensaio, valores de CL50 acima de 1000 µg/mL indicam que os produtos sejam atóxicos. Sendo assim, o EEtOH-Sp e a FaDCM-Sp apresentaram os valores para a CL50% para *A. salina* acima de 1000 µg/mL, sugerindo, portanto, ausência de toxicidade nas condições testadas.

Para assegurar o uso de produtos naturais, deve-se submetê-los a testes pré-clínicos de eficácia e segurança *in vivo*, por métodos recomendados pela legislação. De acordo com a RE 90 (2004), deve-se realizar o Ensaio Toxicológico Pré-clínico Agudo em animais de laboratório previamente padronizado para se obter as informações toxicológicas a respeito do produto testado. Quando devidamente realizado e observado de perto, um teste de toxicidade aguda pode dar mais informações sobre as propriedades biológicas de um composto químico que qualquer outro teste (RAJEH et al, 2012).

Segundo Syahmi et al (2010), a via de administração oral é a via mais conveniente quando se estuda a toxicidade aguda, já que, custa menos e é indolor, não havendo necessidade do uso de anestesia durante a administração de extrato. Ao final do experimento e da análise dos dados coletados, observou-se que não houve alterações relevantes em relação ao sistema nervoso central (SNC) e sistema nervoso autônomo (SNA), nem morte dos animais durante os 14 dias de observação impossibilitando a determinação da DL50. Alterações na massa corpórea, nos pesos dos órgãos sugerem sinais de toxicidade, porém não observados no experimento.

De acordo com Rajeh et al. (2012), o consumo de nutrientes e água é fundamental para o estado fisiológico do animal, e para a realização da resposta correta à substância testada, sendo a observação da ingestão de alimentos e água importante no estudo da segurança de um produto com efeito terapêutico, para se evitar uma falsa resposta devido a condições nutricionais inadequadas e desidratação. Os animais tratados não apresentaram alteração no consumo de água e ração.

Segundo Vaghasiya, Shukla e Chanda (2010), alterações no peso corporal são os índices de efeitos adversos de medicamentos e produtos químicos e é significativo se a perda de peso corporal for superior a 10% do peso corporal inicial. O ganho de peso dos animais tratados com *S. purpurea* foi semelhante ao grupo controle, indicando que ele não tem qualquer efeito secundário adverso sobre este fator.

O coração, fígado, rim, baço e os pulmões são os principais órgãos afetados por reações metabólicas provocadas por substâncias tóxicas (SWAIN, SINHA e MURTHY, 2008; VAGHASIYA, SHUKLA e CHANDA, 2010). O peso deles individualmente, é um importante indicador do estado fisiopatológico em humanos e animais, sendo fundamental para diagnosticar se cada um foi exposto à lesão ou não. Os pesos relativos (%) isolados do fígado, rins, pulmões, baço e coração entre o tratamento e os grupos controle mantiveram-se normais, indicando que o extrato vegetal não foi tóxico para estes órgãos.

No estudo hematológico dos ratos submetidos ao ensaio toxicológico pré-clínico Agudo do extrato etanólico de *S. purpurea*, observou-se apenas uma discreta alteração no CHCM, nos outros parâmetros analisados não foi observada nenhuma alteração. A contagem diferencial de neutrófilos, linfócitos e monócitos revelou pequenas flutuações, que segundo SILVA et al. (2005) não são de importância clínica. Os valores altos de hemácias e plaquetas dos ratos conferem maior viscosidade ao sangue e rápida coagulação (MELO et al, 2012).

Segundo Messias et al (2010), alterações na concentração das enzimas ALT e AST e da FA podem ser indicadores de lesões nas células hepáticas. A ALT é específica para o fígado, a AST está abundantemente presente em outros tecidos

animais, existindo em quantidades mais relevantes no miocárdio, músculos esqueléticos, cérebro e rins. Desta forma, qualquer lesão com destruição celular desses tecidos (à exceção do cérebro) provoca considerável aumento dessas enzimas no sangue (BRANDÃO et al., 2009; MESSIAS et al., 2010).

Através da avaliação dos resultados obtidos a partir das dosagens bioquímicas, não foi observado diferença estatisticamente significativa com o uso do extrato etanólico de *S. purpurea*.

Dessa forma, não foi possível inferir toxicidade ao extrato, uma vez que se tornam necessários experimentos complementares, como os ensaios de toxicidade de doses repetidas, para tal conclusão. De modo que é possível sugerir que o EEtOH-Sp na dose única de 2000 mg/kg não apresentou toxicidade, nas condições avaliadas, o que confere segurança na continuidade do estudo, passando a ser investigada as propriedades farmacológicas da espécie em questão, destacando-se a atividade antidiarreica.

Considerando a não ocorrência de morte dos animais na dose de 2000 mg/kg (v.o.) e, conseqüentemente, a impossibilidade de determinação da DL₅₀, foi possível estabelecer as doses de 125, 250 e 500 mg/kg para o EEtOH-Sp e para a FaDCM-Sp, a fim de prosseguir com a pesquisa da atividade antidiarreica. A escolha das doses encontra-se respaldada no estudo realizado por Souza-Brito (1994), no qual os extratos brutos e seus derivados devem ser testados, em estudos farmacológicos, até a dose de 1000 mg/kg.

Através da avaliação da atividade antimicrobiana pode-se observar que tanto o EEtOH, quanto a FaDCM da *S. purpurea* não apresentaram atividade frente aos microrganismos testados, nas concentrações utilizadas. Esse resultado corroboram com os resultados encontrados por Medeiros *et al* (2012), que avaliou a ação antimicrobiana *in vitro* dos extratos das folhas de *Spondias purpurea* L.(ciriguela), *Spondias mombin* L., e *Azadirachta indica* A.. Para tanto, optou-se pela avaliação da atividade antidiarreica frente ao modelo animal de diarreia secretória, sabendo-se que a *S. purpurea* não atinge a flora intestinal e não apresentaria atividade para o modelo de diarreia infecciosa.

Na indução da atividade antidiarreica nos animais foi utilizado o óleo de rícino ou óleo de mamona, que é extraído das sementes de mamona (*Ricinus communis*), sendo conhecido como um óleo medicinal desde o antigo Egito há mais de 3500 anos. Foi usado primeiramente como purgante ou laxante para combater prisão de ventre (MUTLU e MEIER, 2010; TUNARU et al., 2012).

De acordo com Rouf et al. (2007), o exato mecanismo de ação do óleo de mamona é através da elevada biossíntese de prostaglandinas que provoca a motilidade e a diarreia secretória. Estando associado a dois efeitos: sobre a motilidade gastrointestinal, bem como o transporte de água e electrólitos através da mucosa intestinal (JOSHI, et al., 2012).

O EEtOH-Sp e FaDCM-Sp apresentaram atividade estatisticamente relevante, quanto a inibição da diarreia principalmente nas doses de 250 e 500 mg/Kg. Comprovando a atividade antidiarreica sugerida popularmente, uma vez que foi observada uma diminuição da quantidade de fezes líquidas, de fezes totais e retardo do tempo de início da diarreia.

Os resultados do estudo revelam claramente que o EEtOH-Sp e FaDCM-Sp possuem propriedades antidiarreicas. O extrato etanólico das folhas desta planta pode conter diversos agentes que eficazmente reduzem a diarreia, a qual foi induzida por um potente agente diarreico, o óleo de rícino. A diarreia pode ser caracterizada por diferentes fenômenos, incluindo o fluxo frequente de fezes úmidas, alta motilidade intestinal, grande acúmulo de nutrientes importantes no lúmen do intestino entre outros (BINDER, 2009; TAFESSE e MEKONNEN, 2012).

Segundo, Das et al, (2009), as propriedades antidiarreicas de extratos das plantas são expressas pela sua ação de redução da motilidade intestinal e melhorando reabsorção intestinal, o que pode ser feito através da inibição da liberação de prostaglandina.

A fim de mostrar o potencial anti-inflamatório da *S. purpurea*, foram pesquisados os níveis de PCR-ultrassensível nos modelos animais que foram induzidos à diarreia, já que não há relatos na literatura da pesquisa da PCR neste

tipo de estudo. Este potencial foi comprovado, já que o EEtOH-Sp e FaDCM-Sp diminuíram com significância estatística os níveis desta proteína.

Segundo Faraj e Salem (2012), a PCR é filogeneticamente uma proteína do plasma, que participa da resposta à inflamação sistêmica. Sua concentração plasmática aumenta durante estados inflamatórios, por isso tem sido empregada para fins clínicos. O rápido aumento da síntese de PCR dentro de horas, após a lesão do tecido ou infecção sugere que contribui para a defesa do hospedeiro e que é parte da resposta imune inata.

A PCR é uma proteína de fase aguda positiva, marcador de inflamação sistêmica, que aumenta em resposta a diversos tipos de lesão, principalmente estímulos inflamatórios e sua produção hepática é principalmente estimulada pela interleucina 6 (IL-6) e, seus níveis permanecem relativamente estáveis, sem grande variação diurna, permitindo a sua correta quantificação (SILVA e PAIS DE LACERDA, 2012).

A fim de compreender os eventos fisiopatológicos que ocorrem durante a diarreia, deve-se apreciar o transporte intestinal de íons e água. O enterócito é formado por uma monocamada de epitélio colunar responsável pela absorção e secreção de eletrólitos no intestino. Embora a secreção dos eletrólitos ocorra principalmente na cripta, a absorção ocorre no epitélio ou nas vilosidades da superfície.

Um aumento da concentração de cAMP, ativa CFTR, e este tem um efeito inibitório sobre a condutância dos canais de Na^+ no cólon e permite o fluxo de Na^+ na célula ao longo do seu gradiente eletroquímico. Nos episódios de diarreia, especialmente secretória, o paciente comumente apresenta uma elevada perda iônica. O CFTR pode atuar em quase todas as vias de absorção de eletrólitos (KOPIC e GEIBEL, 2010). Na observação do perfil iônico durante a diarreia, pode-se constatar que a utilização do EEtOH-Sp ou FaDCM-Sp reduziu a perda dos íons sódio (Na^+), potássio (K^+), cloro (Cl^-) e íon bicarbonato (HCO_3^-) consideravelmente.

Após estudo histológico do íleo dos animais com diarreia e tratamento com a FaDCM-Sp, observou-se que a mesma apresentou eficácia na reparação do tecido,

reduzindo os danos causados pelo óleo de rícino. Houve diminuição da infiltração de células inflamatórias nos espaços subepiteliais e redução da perturbação das glândulas intestinais da região superficial do íleo.

Ao investigar o efeito do EEtOH-Sp ou FaDCM-Sp, no esvaziamento gástrico observou-se que, estes não apresentaram ação significativa, bem como no trânsito intestinal. Fato interessante, já que não provoca constipação como os demais medicamentos para diarreia, corroborando com os estudos de Joshi e colaboradores (2012).

O estudo demonstrou que tanto o EEtOH, quanto a FaDCM de *S. purpurea* apresentam atividade antidiarreica e não alteraram a motilidade intestinal. Resultado semelhante ao observado por Joshi (2012) com a *Oroxylum indicum*, planta medicinal tradicional da China, Índia e Japão. A *S. purpurea* teve atividade junto à diarreia secretória experimental, sem abrandar o ritmo de trânsito, apresentou efeito antiinflamatório e diminuiu a perda de íons, o que é de interesse clínico potencial já que atualmente agentes antidiarreicos usados são frequentemente associados a efeitos colaterais, como a prisão de ventre.

Conclusão



7. CONCLUSÃO

Nos últimos anos, o interesse popular e institucional por plantas medicinais vem crescendo e com isso fortalecendo a fitoterapia no SUS. Para tal, faz-se necessário que os profissionais da área de saúde conheçam as atividades farmacológicas e a toxicidade das plantas medicinais de cada bioma brasileiro, de acordo com os costumes, tradições e condição socioeconômica da população.

A *Spondias purpurea* é uma planta do semi-árido Nordeste Brasileiro, de fácil acesso a população local e utilizada popularmente como antidiarreico. Esta pesquisa foi realizada buscando a comprovação pré-clínica desta atividade. Inicialmente foi realizada a determinação fitoquímica e

Os resultados mostraram que o EEtOH-Sp apresentou em sua composição química flavonoides e polifenóis totais, assim como baixa toxicidade frente aos ensaios toxicológicos realizados, mostrando a possibilidade de ser utilizada como um possível fitoterápico.

O EEtOH e FaDCM de *Spondias purpurea* não apresentaram atividade antimicrobiana nas concentrações e microorganismos testados, mostrando que não atinge a flora bacteriana intestinal. Apresentou atividade antidiarreica e diminuiu os níveis de inflamação aguda, através da diminuição dos níveis de Proteína C-Reativa; fato que tem a perspectiva de investigação para outras enfermidades.

O EEtOH-Sp em todas as suas doses e a FaDCM-Sp nas doses de 250 e 500 mg/Kg apresentaram-se eficientes quanto a diminuição da perda dos íons Na^+ , K^+ , Cl^- e HCO_3^- . A FaDCM-Sp apresentou-se eficaz na reparação do tecido do íleo, reduzindo os danos causados e não apresentou alteração no trânsito intestinal normal.

Podendo-se concluir que *Spondias purpurea* pode ser um possível antidiarreico, corroborando com o uso da medicina tradicional, que não causa constipação, não atinge a flora bacteriana intestinal e com atividade anti-inflamatória. Estas atividades podem ser atribuídas a presença dos metabólitos secundários polifenóis - terpenos e flavonoides, que desempenham papel fundamental na

inibição dos radicais livres e no combate ao processo inflamatório da mucosa intestinal e que pode ser pesquisado junto a outros tipos de diarreia.



Perspectivas

PERSPECTIVAS

- Realizar o ensaio toxicológico pré-clínico agudo da FaDCM-Sp;
- Realizar o ensaio toxicológico de doses repetidas do EEtOH-Sp e da FaDCM-Sp;
- Fazer a determinação fitoquímica de flavonoides e polifenóis totais da FaDCM-Sp;
- Pesquisar a atividade antidiarreica do EEtOH-Sp e da FaDCM-Sp frente à outros tipos de diarreia, como a iônica, que é induzida por sulfato de magnésio;



Referências

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, B. P.; SELLIN, J. H. Drug-induced, factitious, & idiopathic diarrhoea. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, v.26, p. 633–648, 2012.
- AGRA, M. de F.; SILVA, K. N.; BASÍLIO, I. J. L. D.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. p. 18, n. 3, p. 472-508, 2008.
- AJAIYEGBA, E. O.; ABIODIUM, O. O.; FALADE, M. O.; OGBOLE, N. O.; ASHIDI, J. S.; HAPPI, C. T.; AKINBOYE, D. O. In vitro cytotoxicity studies of 20 plants used in Nigerian antimalarial ethnomedicine. *Phytomedicine*, v. 13, p. 295-29, 2006.
- ALLAHTAVAKOLI, M.; MORADI, R.; SHAMSI, S.; AFSHARMANESH, K. Effect of Hydro-Alcoholic Extract of *Teucrium Polium* on Castor Oil-Induced Diarrhea in Male Rat. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*. v. 15, n. 6, p. 54-57, 2013.
- ALMEIDA, R. N.; FALCÃO, A. C. G. M.; DINIZ, R. S. T.; QUINTANAS-JÚNIOR, L. J.; POLARI, R. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; AGRA, M. de F.; DUARTE, J. C.; FERREIRA, C. D.; ANTONIOLLI, A. R.; ARAÚJO, C. C. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no Sistema Nervoso Central e alguns dados experimentais. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 80, p. 72-76, 1999.
- ALMEIDA, R. N.; OLIVEIRA, T. M. L. Triagem Farmacológica Comportamental. Em: ALMEIDA, R. N. *Psicofarmacologia – Fundamentos Práticos*. Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, p. 131-137, 2006.
- AMABEOKU, G. J. e BAMUAMBA, K. Evaluation of the effects of *Olea europaea* L. subsp. *Africana* (Mill.) P.S. Green (Oleaceae) leaf methanol extract against castor oil-induced diarrhoea in mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. v. 62, p. 368–373, 2010.
- AMARAL, D. G.; SCHARFMAN, H. E.; LAVENEX, P. The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Progress in Brain Research*. v. 163, p. 3–22, 2007.
- ARANDA-MICHEL, J.; GIANNELLA, R. A. G. Acute Diarrhea: A Practical Review. *The American Journal of Medicine*, v. 106, 1999.
- ARIF, M.; FAREED, S.; HUSSAIN, S. Estimation of antioxidant activity of microwave assisted extraction of total phenolics and flavonoids contents of the fruit *Spondias mangifera* Willd. *Asian Journal of Traditional Medicines*, v. 6, n. 4, 2011.
- ARIF, M.; ZAMAN, K.; FAREED, S.; HUSSAIN, S. Antibacterial, antidiarrhoeal and ulcer-protective activity of methanolic extract of *Spondias mangifera* bark. *International Journal of Health Research*, v.1, n.4, p.177-182, 2008.

- AUGUSTO, P.E.D.; CRISTIANINI, M.; IBARZ, A. Effect of temperature on dynamic and steady-state shear rheological properties of siriguela (*Spondias purpurea* L.) pulp. **Journal of Food Engineering**, v.108, p.283–289, 2012.
- AWOUTERS, F.; NIEMEGERES, C. J. E.; LENAERTS, F. M.; JANSEEN, P. A. J. Delay of castor oil diarrhoea in rats: A new way to evaluate inhibitors of prostaglandin synthesis. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v.30, p.41-45, 1978.
- BARBUTI, R. C. Diarréias agudas. Aspectos clínicos, etiológicos e terapêuticos. **Revista Brasileira de Medicina**. p. 3-12, 2008.
- BIRD, T.; DASWANI, P.; BRIJESH, S; TETALI, P.; NATU, A.; ANTIA, N. Newer insights into the mechanism of action of *Psidium guajava* L. leaves in infectious diarrhoea. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 10, p.33, 2010.
- BINDER, H. J. Causes of Chronic Diarrhea. **The New England Journal of Medicine**. v. 355, n. 3, p. 236-239, 2009.
- BLUSH, R. R. e MATZO, M. Acute Infectious Diarrhea: An overview of causes, preventives, and treatments. **Evidence for Excellence**. v. 112, n. 8, p. 65-68, 2012.
- BOLIGON, A. A.; AGERTT, V.; JANOVIK, V.; CRUZ, R. C.; CAMPOS, M. M. A.; GUILLAUME, D.; ATHAYDE, M. L.; SANTOS, A. R. S. Antimycobacterial activity of the fractions and compounds from *Scutia buxifolia*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v. 22, n.1, p.45-52, 2012.
- BRANDÃO, I. C.; SUZUKI, M. S.; LAS CASAS, L.; PETERS, V. M. Avaliação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos em ratas gestantes tratadas com extrato aquoso de piper methysticum: observações preliminares. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**, v. 1, n. 4, p. 18-22, 2009.
- BRASIL. ANVISA. **Decreto Nº 5.813, de 22 de junho de 2006**. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 23 jun. 2006.
- BRASIL. ANVISA. **Resolução no. 90 de 16 de março de 2004d**. Dispõe sobre o Guia para os estudos de toxicidade de medicamentos fitoterápicos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 mar. 2004.
- BRASIL. ANVISA. **Resolução RDC nº. 14, de 31 de abril de 2010d**. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 31 abr. 2010.
- BRAZ-FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33, p. 229-239, 2010.

BRITO, A.F.; SILVA, G.A.; FIGUEIRA, A.C.G. Avaliação da Toxicidade de Plantas Medicinais Brasileiras por meio do Bioensaio com *Artemia salina*. **JIC-Jornada de Pesquisa e Iniciação Científica**, v. 3, n. 3, 2012.

BUFAINO, E. M.. Phytotherapy in Brazil: recovering the concepts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 23, n.1, p. 22-27, 2013.

CARVALHO, Ana C. B.; BALBINO, E. E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J. P. S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 18, n. 2, p. 314-319, 2008.

CHANDRA, S.; MEJIA, E. G. Polyphenolic Compounds, Antioxidant Capacity, and Quinone Reductase Activity of an Aqueous Extract of *Ardisia compressa* in Comparison to Mate (*Ilex paraguariensis*) and Green (*Camellia sinensis*) Teas. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, n.1, p 3583–3589, 2004.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUT. **Performance standard for antimicrobial susceptibility testing**. Document M100–S19. CLSI, Wayne, Pa, 2009.

CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA. **Resolução Nº 1000, de 11 de maio de 2012**. Dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais, e dá outras providências. Diário Oficial da União (DOU), 17 de maio de 2012. Disponível em URL: http://www.cfmv.org.br/portal/legislacao/resolucoes/resolucao_1000.pdf [02 abril 2013].

DAS, A. K.; ROHINI, R. M.; HEMA, A. Evaluation of anti-diarrhoeal activity of *Rhizophora mucronata* bark extracts. **The Internet Journal of Alternative Medicine**, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2009.

DEEPAK, P. e EHRENOREIS, E. D. **Diarrhea**. v. 57, p. 490-510, 2011.

DENARDI, C. A. S.; FILHO, A. C.; CHAGAS, A. C. P. A Proteína C-Reativa na Atualidade. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado do Rio de Janeiro**. v. 21, n.5, p. 329-334, 2008.

DONOWITZ, M.; ALPERS, D. H.; BINDER, H. J.; BREWER, T.; CARRINGTON, J.; GREY, M. J. Translational Approaches for Pharmacotherapy Development for Acute Diarrhea. **Gastroenterology**. v. 142, p. e1–e9, 2012.

ENGELS, C.; GRÄTER, D.; ESQUIVEL, P.; JIMÉNEZ, V. M.; GÄNZLE, M. G.; SCHIEBER, A. Characterization of phenolic compounds in jocote (*Spondias purpurea* L.) peels by ultra high performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. **Food Research International**, v. 46, p. 557–562, 2012.

ELOFF, J.N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Medica**. v. 64, 711–713, 1998.

FARAJ, M.; SALEM, N. C-Reactive Protein. **Blood Cell – An Overview of Studies in Hematology**. cap. 5, p. 89-100, 2012.

FARTING, M. F.; SALAM, M. A.; LIMDBERG, G.; DITE, P.; KHALIF, I.; SALAZAR-LINDO, E.; RAMAKRISHNA, B. S.; GOH, K.; THOMPSON, A.; KHAN, A. G.; KRABSHUIS, J.; LEMAIR, A. Acute Diarrhea in Adults and Children: A Global Perspective. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 47, n. 1, 2013.

FOSS-FREITAS, M. C.; JUNIOR, W. M.; FOSS, M. C. Neuropatia Autonômica: Uma Complicação de Alto Risco no Diabetes Melito Tipo 1. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**. v. 52, n. 2, p. 398-406, 2008.

GACHET, M. S.; LECARO, J. S.; KAISER, M.; BRUN, R.; NAVARRETE, H.; MUNOZ, R. A.; BAUERA, R.; SCHÜHLY, W. Assessment of anti-protozoal activity of plants traditionally used in Ecuador in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 128, p. 184–197, 2010.

GOODGAME, R. A Bayesian Approach to Acute Infectious Diarrhea in Adults. **Gastroenterology Clinics of North America**. v. 35, p. 249-273, 2006.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects Medicine**, v. 27, n. 1, p. 1-93, 2006.

GUTIERREZ, S. P.; SANCHEZ, M.A.Z.; GONZALEZ, C.P.; GARCIA, L.A. Antidiarrhoeal activity of different plants used in traditional medicine. **African Journal of Biotechnology**. v. 6, p. 2988-2994, 2007.

HOSTOS, E. L.; CHOY, R. K.M.; NGUYEN, T. Review: Developing novel antisecretory drugs to treat infectious diarrhea. **Future Medicinal Chemistry**. v. 3, n. 10, p. 1317-1325, 2011.

HOU, F. Q.; WANG, Y. W.; LI, J.; WANG, G. Q. ; LIU, Y. Management of acute diarrhea in adults in China: a cross-sectional survey. **BMC Public Health**, v. 13, p. 41, 2013.

HUDA, T. Md. N.; UNICOMB, L.; JOHNSTON, R. B.; HALDER, A. K.; SHARKER, Md. A. Y.; LUBY, S. P. Interim evaluation of a large scale sanitation, hygiene and water improvement programme on childhood diarrhea and respiratory disease in rural Bangladesh. **Social Science & Medicine**. v. 75, p. 604-611, 2012.

JOSHI, S. V.; GANDHI, T. R.; VYAS, B. A.; SHAH, P. D.; PATEL, P. K.; VYAS, H. G. Effect of *Oroxylum indicum* on intestinal motility in rodents. **Orient Pharm Exp Med**. v. 12, p. 279–285, 2012.

JÚNIOR, W. S. F.; SIQUEIRA, C. F. Q. e ALBUQUERQUE, U. P. Plant StemBark Extractivism in the Northeast Semiarid Region of Brazil: A New Aport to Utilitarian Redundancy Model. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. v. 2012.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

KHAZAEI, M. e SALEHI, H. Protective Effect of *Falcaria vulgaris* Extract on Ethanol Induced Gastric Ulcer in Rat. **Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics**. v. 5, n. 1, p. 43-46, 2006.

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M.L.; MELLO, J. C. P. Fitoterápicos: um mercado promissor. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v. 30, n. 3, p.241-248, 2009.

KOPIC, S. e GEIBEL, J. P. Toxin Mediated Diarrhea in the 21st Century: The Pathophysiology of Intestinal Ion Transport in the Course of ETEC, *V. cholerae* and Rotavirus Infection. **Toxins**. v. 2, n. 8, p. 2132-2157, 2010.

KOTS, A. Y.; CHOI, B. K.; ESTRELLA-JIMENEZ, M. E.; WARREN, C. A.; GIBERTSON, S. R.; GUERRANT, R. L.; MURAD, F.. Pyridopyrimidine derivatives as inhibitors of cyclic nucleotide synthesis: Application for treatment of diarrhea. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 105, n. 24, p. 8440–8445, 2008.

LEMOS, M.; SANTIN, J. R.; JÚNIOR, L. C. K.; NIERO, R.; ANDRADE, S. F. Gastroprotective activity of hydroalcoholic extract obtained from the leaves of *Brassica oleracea* var. *acephala* DC in different animal models. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 138, p. 503– 507, 2011.

LOPES, W. B., MORONI, F. T., BRANDEBURGO, M. I. H. e HAMAGUCHI, A. Desenvolvimento de um método alternativo ao uso de animais de laboratório para avaliação da toxicidade de extratos vegetais. Disponível em: <www.propp.ufu.br/revistaeletronica/B/Desenvolvimento.PDF> Acesso em: 3 de julho de 2004.

LUKACIK, M; THOMAS, R. L.; ARANDA, J. V. A meta-analysis of the effects of oral zinc in the treatment of acute and persistent diarrhea. **Pediatrics**. v. 121, n. 2, p. 326-36, 2008.

MACHADO, H.; NAGEM, T. J.; PETERS, V. M.; FONSECA, C. S.; OLIVEIRA, T. T. Flavonóides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, v. 27, n. 1/2, p. 33-39, 2008.

MAXWELL I, E.; IHECHILURU I, E.; MADUBUIKE KELECHI G, UDEH NKIRU E., UKWENI IHEANACHO A., AKOMAS STELLA C., IFENKWE DANIEL C. Antidiarrheal activity of *Pterocarpus erinaceus* methanol leaf extract in experimentally-induced diarrhea. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, 2012.

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

- MEDA, A.; LAMIEN, C. E.; ROMITO, M.; MILLOGO, J.; NACOULMA, O. G. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. **Food Chemistry**, v. 91, n. 3, 2005, p 571–577.
- MEDEIROS, A. J. D.; FEIJÓ, F. M. C.; SANTOS, C. S.; LUCAS, C. R. e MELO, D. D. M. B.. "Avaliação da atividade antimicrobiana das plantas *Spondias purpurea* L., *Spondias mombin* L., e *Azadirachta indica* A. sobre cepas isoladas de caprinos com aptidão leiteira." In **VII CONNEPI-Congresso Norte Nordeste de Pesquisa e Inovação**. 2012.
- MELO, M. G. D.; DÓRIA, G. A. A.; SERAFINI, M. R.; ARAÚJO, A. A. S. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe. **Scientia plena**, v. 8, n. 9, p. 1-6, 2012.
- MESSIAS, J. B.; CARACIOLO, M. C. M.; OLIVEIRA, I. M.; MONTARROYOS, U. R.; BASTOS, I. V. G. A.; GUERRA, M. O.; SOUZA, I. A. Avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos de ratas no segundo terço da gestação submetidas à ação do extrato metanólico de *Cereus jamacaru* DC., Cactaceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v. 20, n. 4, p. 478-483, 2010.
- MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; JEPUTNAN, L. B.; JACOBSEN, N. D. E.; McLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp lethality bioassay method. **Planta Medica**, v. 45, p. 31-34, 1982.
- MITTAL, S. K.; MATHEW, J. L. Regulating the Use of Drugs in Diarrhea. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**. v. 33, p. S26–S30, 2001.
- MUSUMBA, C.; PRITCHARD, D. M.; PIRMOHAMED, M. Review article: cellular and molecular mechanisms of NSAID-induced peptic ulcers. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**. v. 30, p. 517–531, 2009.
- MUTLU, H.; MEIER, M. A. R. Castor oil as a renewable resource for the chemical industry. **European Journal of Lipid Science and Technology**. n. 112, p. 10–30, 2010.
- B. NCUBE, B.; FINNIE, J. F.; VAN STADEN, J. In vitro antimicrobial synergism within plant extract combinations from three South African medicinal bulbs. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 139, p. 81– 89, 2012.
- NJOKU, P. C.; AKUMEFULA, M. I. Phytochemical and Nutrient Evaluation of *Spondias Mombin* Leaves. **Pakistan Journal of Nutrition**. v. 6, n. 6, p. 613-615, 2007.
- OLIVEIRA, F. C. S.; BARROS, R. F. M.; MOITA NETO, J. M. Plantas medicinais utilizadas em comunidades rurais de Oeiras, semiárido piauiense. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.12, n.3, p.282-301, 2010.

PASSARIELLO, A.; TERRIN, G.; MARCO, G.; CECERE, G.; RUOTOLO, S.; MARINO, A.; COSENZA, L.; TARDI, M.; NOCERINO, R.; CANANI, R. B. Efficacy of a New Hypotonic Oral Rehydration Solution Containing Zinc and Prebiotics in the Treatment of Childhood Acute Diarrhea: A Randomized Controlled Trial. **The Journal of Pediatrics**. v. 158, p. 288-92, 2011.

PELL, S. K.; MITCHELL, J. D.; MILLER, A. J.; LOBOVA, T. A. The Families and Genera of Vascular Plants. Flowering Plants. Eudicots. *Anacardiaceae*. **Springer Berlin Heidelberg**. v. 10, p. 7-50, 2011.

PROBST, I. S. **Atividade Antibacteriana de Óleos Essenciais e Avaliação de Potencial Sinérgico**. Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biomoléculas – Estrutura e função. Instituto de Biociências, UNESP, p. 17, Botucatu, 2012.

RAJEH, M.A; KWAN, Y.P; ZAKARIA, Z; LATHA, L.Y; JOTHY, S.L; SASIDHARAN, S. Acute toxicity impacts of euphorbia hirta I extract on behavior, organs body weight index and histopathology of organs of the mice and artemia salina. **Pharmacognosy Res**. v. 4, n. 3, p. 170-7, 2012.

RICCIOTTI, E. e FITZGERALD, G. A. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology: Prostaglandins and Inflammation. **Journal of the American Heart Association**. v. 31, p. 986-1000, 2011.

ROUF, R.; UDDIN, S. J.; SHILPI, J. A.; ALAMGIR, M. Assessment of antidiarrhoeal activity of the methanol extract of *Xylocarpus granatum* bark in mice model. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 109, p.539–542, 2007.

SANTOS, C. A. F.; OLIVEIRA, V. R. Inter-Relações Genéticas entre Espécies do Gênero *Spondias* com Base em Marcadores AFLP. **Revista Brasileira Fruticultura**, v. 30, n. 3, p. 731-735, 2008.

SATPATHY, G.; TYAGI, Y.K.; GUPTA, R.K. Preliminary evaluation of nutraceutical and therapeutic potential of raw *Spondias pinnata* K., an exotic fruit of India. **Food Research International**, v. 44, p. 2076-2087, 2011.

SCARPIGNATO, S., CAPOVILLA, T.; BERTACCINI, G. Action of caerulein on gastric emptying of conscious rat. **Arch. Int. Pharmacodyn**. v. 246, p. 286-294, 1980.

SCHILLER, L. R. Diarrhea. **Medical Clinics Of North America**. v. 84, p. 1259-1274, 2000.

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

SILVA, D.; PAIS DE LACERDA, A. Proteína C reativa de alta sensibilidade como biomarcador de risco na doença coronária. **Revista Portuguesa de Cardiologia**. v.31, p.733-45, 2012.

SILVA, E. J. R.; AGUIAR, F. J. S.; GONÇALVES, E. S.; SOUSA, I. M. V.; DIMECH, G. S.; FRAGA, M. C. C. A.; COELHO, M. C. O. C.; WANDERLEY, A. G. Avaliação do tratamento subcrônico com o extrato hidroalcoólico de *Calendula officinalis* L. sobre os parâmetros bioquímicos e hematológicos em ratas Wistar. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 15, p. 88-93, 2005.

SILVA, N. L. A.; MIRANDA, F. A. A.; CONCEIÇÃO, G. M. Triagem Fitoquímica de Plantas de Cerrado, da Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão. **Scientia Plena**. v.6, n. 2, 2010.

SILVEIRA, P. F.; BANDEIRA, M. A. M.; ARRAIS, P. S. D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 18, n. 4, p. 618-626, 2008.

SOUZA, W. J. M.; OLIVEIRA, J. F. F.; NICOLETE, R. Plantas Medicinais com Potencial Atividade Anti-inflamatória Utilizadas pela População: Um Guia Prático e Ilustrativo. **Revista Florence**. v. 1, n.1, p. 1-23, 2011.

SOUZA-BRITO, A. R. M. **Manual De Ensaio Toxicológicos "In Vivo"**. Campinas – SP: Editora UNICAMP, p. 122, 1994.

STARK, T. D.; MTUI, D. J. BALEMBA, O. B. Ethnopharmacological Survey of Plants Used in the Traditional Treatment of Gastrointestinal Pain, Inflammation and Diarrhea in Africa: Future Perspectives for Integration into Modern Medicine. **Animals**. v. 3, p. 158-227, 2013.

STICKNEY, J. C.; NORTHUP, D. W. Effect of gastric emptying upon propulsive motility of small intestine in rat. **Experimental Biology and Medicine**. v.101, p. 582-583, 1959.

SWAIN, S. R.; SINHA, B. N.; MURTHY, P. N. Subchronic toxicity studies of the hydroalcoholic extract of *Rungia pectinata* leaves. **Pharmacologyonline**. v. 2, p. 461-66, 2008.

SWEETSER, S. Evaluating the patient with diarrhea: A case-based Approach. 2012.

SYAHMI, A.R.M.; VIJAYARATHNA, S.; SASIDHARAN, S.; LATHA, L.Y.; KWAN, Y.P.; LAU, Y.L.; SHIN, L.N.; CHEN, Y. Acute oral toxicity and brine shrimp lethality of *Elaeis guineensis* Jacq., (oil palm leaf) methanol extract. **Molecules**. v. 15, p. 8111-21, 2010.

TAFESSE, G.; MEKONNEN, Y. Anti-diarrheal activity of leaf extract of *Juniperus procera* and its effect on intestinal motility in albino mice. **Journal of Medical and Biomedical Sciences**. v. 1, n. 4, p. 7-12, 2012.

TAHA, M. M. E.; SALGA, M. S.; ALI, H. M.; ABDULLA, M. A.; ABDELWAHAB, S. I.; HADI, A. H. A. Gastroprotective activities of *Turnera diffusa* Willd. Ex Schult.

revisited: Role of arbutin. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 141, p. 273– 281, 2012.

TSAMPALIEROS, A.; GRIFFITHS, A. M.; BARROWMAN, N.; MACK, D. R. Use of C-Reactive Protein in Children with Newly Diagnosed Inflammatory Bowel Disease. **Journal of Pediatrics**. v. 2, p.159-340, 2011.

TUNARU, S.; ALTHOFF, T. F.; NÜSINGB, 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**. v. 109, n. 23, p. 9179–9184, 2012.

VAGHASIYA, Y. K.; SHUKLA, V. J.; CHANDA, S. V. Acute oral toxicity study of *Pluchea arguta* boiss extract in mice. **Journal of Pharmacology and Toxicology**. v. 6, p. 113-23, 2010.

VANNUCCI, F. A.; GUEDES, R. M. C. Fisiopatologia das diarreias em suínos. **Ciência Rural, Santa Maria**, v.39, n.7, p. 2233-2242, 2009.

VEIGA JUNIOR, V. F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Revista Brasileira Farmacognosia**. Braz J. Pharmacogn. v.18, n.2, p. 308-313, 2008.

VICTORA, C. G. Diarrhea mortality: what can the world learn from Brazil? **Jornal de Pediatria**. v. 85, n. 1, 2009.

WENZL, H. H. Diarrhea in Chronic Inflammatory Bowel Diseases. **Gastroenterology Clinics of North America**. v. 41, p. 651–675, 2012.

WGO, **World Gastroenterology Organisation**, Guia Prático da Organização Mundial de Gastroenterologia: Diarréia Aguda, 2008.

WIART, C. Medicinal plants classified in the family Anacardiaceae. **Medicinal Plants of Asia and the Pacific**. Boca Raton, FL: CRC Press p. 177-183, 2006.

WONGSAMITKUL, N.; SIRIANANT, L.; MUANPRASAT, C.; CHATSUDTHIPONG, V. A Plant-Derived Hydrolysable Tannin Inhibits CFTR Chloride Channel: A Potential Treatment of Diarrhea. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 3, 2010.



ANEXOS

Anexo 1



Protocolo utilizado na Triagem Farmacológica

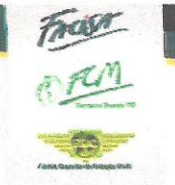
Atividade farmacológica	Quantificação dos efeitos (0) sem efeito, (-) efeito diminuído, (+) efeito presente, (++) efeito intenso				
	até 30`	1 h	2 h	3 h	4 h
1 – SNC					
a – Estimulante					
Hiperatividade					
Irritabilidade					
Agressividade					
Tremores					
Convulsões					
Piloereção					
Movimento intenso das vibrissas					
Outras					
b – Depressora					
Hipnose					
Ptose					
Sedação					
Anestesia					
Ataxia					
Reflexo do endireitamento					
Catatonía					
Analgesia					
Resposta ao toque diminuído					
Perda do reflexo corneal					
Perda do reflexo auricular					
c – Outros comportamentos					
Ambulação					
Bocejo excessivo					
Limpeza					
Levantar					
Escalar					
Vocalizar					
Sacudir a cabeça					
Contorções abdominais					
Abdução das patas do trem posterior					
Pedalar					
Estereotípia					
2 - SN AUTÔNOMO					
Diarréia					
Constipação					
Defecação aumentada					
Respiração forçada					
Lacrimajamento					
Micção					
Salivação					
Cianose					
Tono muscular					
Força para agarrar					
3 – MORTE					

Observações complementares.: _____

Responsável Técnico

Anexo 2




**CENTRO DE ENSINO SUPERIOR E DESENVOLVIMENTO
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DE CAMPINA GRANDE
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA/CESED**


PARECER

**CEUA: n °11
NÚMERO DO PROJETO: 0020/16102012
PENDENTE EM 16/10/2012
APROVADO EM: 12/12/2012**

- 1. Pesquisador Responsável:**
Prof. Dr.ª Mônica Oliveira da Silva Simões
Orientanda:
Katharina Rodrigues de Lima porto Ramos
- 2. Título do Projeto:**
Avaliação da atividade antidiarréica de Spondias (Anacardiaceae)
- 3. Objetivo:**
Avaliação da atividade antidiarréica dos estratos etanólicos brutos e das fases obtidos das folhas de Spondias (Anacardiaceae)
- 4. Considerações:**
Considerando que a Mestranda Katarina R. L. P. Ramos, orientanda da Prof.Dra. Mônica O. da S. Simões, acataram as solicitações de mudança no projeto, principalmente na redução do número de animais sem comprometer a análise. Estando o projeto bem discriminado e coerente com as normas de utilização de animais, cumprindo os requisitos da Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, e as demais normas aplicáveis à utilização de animais para o ensino e pesquisa, especialmente as resoluções do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA. O protocolo de pesquisa está devidamente preenchido, com todos os itens solicitados entregue a CEUA/CESED.
- 5. Parecer Final:**
APROVADO



Tharcia Kiara B. de Oliveira
Coordenadora do CEUA-CESED



Av. Senador Argemiro de Figueiredo, 1901 - Itararé
CEP 56411-020 | Campina Grande - PB | (63) 2101.8800
www.cesed.br | facisa@cesed.br | fcm@cesed.br | esac@cesed.br
CNPJ.: 02.108.023/0001-40