

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
Faculdade de Medicina
Departamento de Fisiologia e Farmacologia

**AVALIAÇÃO EXPERIMENTAL DA ATIVIDADE
ANTIDIARRÉICA DO LÁTEX DO *CROTON URUCURANA*
BAILL.**

Luilma Albuquerque Gurgel

Fortaleza - Ceará
2000

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
Faculdade de Medicina
Departamento de Fisiologia e Farmacologia

Luilma Albuquerque Gurgel

**AVALIAÇÃO EXPERIMENTAL DA ATIVIDADE
ANTIDIARRÉICA DO LÁTEX DO *CROTON URUCURANA*
BAILL.**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Vietla Satyanarayana Rao

Fortaleza - Ceará
2000

G987a Gurgel, Luilma Albuquerque

Avaliação experimental da atividade antidiarréica do látex do
Croton urucurana Baill. / Luilma Albuquerque Gurgel. -
Fortaleza, 2000.

125 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Vietla Satyanarayana Rao.

Dissertação (Mestrado). - Universidade Federal do Ceará.
Departamento de Fisiologia e Farmacologia.

1. Croton 2. Antidiarréicos

CDD 583.95

AVALIAÇÃO EXPERIMENTAL DA ATIVIDADE ANTIDIARRÉICA DO LÁTEX DO *CROTON URUCURANA* BAILL.

Esta dissertação foi submetida como parte dos requisitos necessários a obtenção do Grau de Mestre em Farmacologia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se a disposição dos interessados na Biblioteca do Centro de Ciências da Saúde da referida Universidade.

A citação de qualquer trecho desta Dissertação é permitida, desde que seja feita em conformidade com as normas da ética.

Dissertação aprovada em: ____/____/____

Banca examinadora:

Prof. Dr. Vietla Satyanarayana Rao
(Orientador)

Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima

Prof. Dr. Armenio Aguiar dos Santos

A Deus e meus pais.

AGRADECIMENTOS

A Deus por todas as oportunidades que tem me dado.

A meus pais, meus irmãos e meu namorado, Ari, pelo apoio e compreensão durante o período do curso.

Ao Prof. Vietla Satyanarayana Rao, pela orientação científica, dedicação e paciência durante a realização deste trabalho e principalmente por sua valiosa amizade.

Ao Prof. Domingos Tabajara de Oliveira Martins e seu aluno Paulo Orlandi Mattos pelo fornecimento do material estudado.

Aos amigos do Curso de Pós-Graduação e do Laboratório de Produtos Naturais e a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

*“Não é suficiente que saibamos,
precisamos também aplicar.*

*Não é suficiente que tenhamos boas
intenções, devemos também agir”.*

Goethe

SUMÁRIO

Lista de Tabelas.....	x
Lista de Figuras.....	xii
Lista de Abreviaturas.....	xiv
Resumo.....	xvi
 INTRODUÇÃO	 1
1 Gravidade das doenças diarréicas.....	2
2 Diarréia.....	4
2.1 Classificação da diarréia.....	7
2.1.1 Diarréia infecciosa aguda.....	8
2.1.2 Diarréia do viajante.....	12
2.1.3 Diarréia persistente.....	12
2.1.4 Diarréia crônica.....	13
3 Medicamentos utilizados no tratamento da diarréia.....	13
4 Medicamentos que alteram o trânsito intestinal.....	14
5 A cólera.....	18
6 O óleo de rícino.....	18
7 O uso de plantas medicinais	18
8 Plantas medicinais usadas no tratamento da diarréia.....	20
9 O gênero <i>Croton</i>	23
10 O <i>Croton urucurana</i> Baillon.....	28
11 Objetivos.....	33
 MATERIAIS E MÉTODOS	 35
1 Animais experimentais.....	36
2 Coleta e identificação do material botânico.....	36
3 Soluções fisiológicas.....	37
4 Reagentes e drogas.....	37
5 Análise fitoquímica.....	38
6 Toxicidade aguda.....	38

7 Atividade do látex do <i>Croton urucurana</i> Baill. em modelos de diarreia induzida por óleo de rícino.....	39
7.1 Diarreia induzida por óleo de rícino em ratos.....	39
7.2 Diarreia induzida por óleo de rícino em camundongos.....	40
8 Atividade do látex do <i>Croton urucurana</i> Baill. sobre o trânsito gastrintestinal.....	41
8.1 Trânsito gastrintestinal em camundongos.....	41
8.2 Trânsito gastrintestinal estimulado por fisostigmina em camundongos.....	43
9 Atividade do látex do <i>Croton urucurana</i> Baill. sobre a secreção intestinal.....	44
9.1 Secreção intestinal induzida por toxina da cólera em camundongos.....	44
10 Atividade do látex do <i>Croton urucurana</i> Baill. sobre a motilidade intestinal.....	45
10.1 Contrações induzidas por agonistas em jejuno isolado de rato <i>in vitro</i>	45
11 Métodos estatísticos.....	46
RESULTADOS	47
1 Análise fitoquímica.....	48
2 Toxicidade aguda.....	48
3 Atividade do látex do <i>Croton urucurana</i> Baill. em modelos de diarreia induzida por óleo de rícino.....	51
3.1 Diarreia induzida por óleo de rícino em ratos.....	51
3.2 Diarreia induzida por óleo de rícino em camundongos.....	54
4 Atividade do látex do <i>Croton urucurana</i> Baill. sobre o trânsito gastrintestinal.....	62
4.1 Trânsito gastrintestinal em camundongos.....	62
4.2 Trânsito gastrintestinal estimulado por fisostigmina em camundongos.....	72
5 Atividade do látex do <i>Croton urucurana</i> Baill. sobre a secreção intestinal.....	75
5.1 Secreção intestinal induzida por toxina da cólera em camundongos.....	75
6 Atividade do látex do <i>Croton urucurana</i> Baill. sobre a motilidade intestinal.....	78
6.1 Contrações induzidas por agonistas em jejuno isolado de rato <i>in vitro</i>	78

DISCUSSÃO.....	81
CONCLUSÕES.....	99
SUMMARY.....	101
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103

Lista de Tabelas

Tabela	Página
1 Resultado da análise fitoquímica do látex do <i>Croton urucurana</i> (LCU).....	49
2 Percentual de mortes, no período de 24 horas, após o tratamento oral com o látex do <i>Croton urucurana</i> (LCU).....	50
3 Efeito do látex do <i>Croton urucurana</i> (LCU) no modelo de diarreia induzida por óleo de rícino em ratos.....	52
4 Efeito da Naloxona e L-Arginina sobre a ação do látex do <i>Croton urucurana</i> (LCU) no modelo de diarreia induzida por óleo de rícino em ratos.....	53
5 Efeito do látex do <i>Croton urucurana</i> (LCU) sobre a quantidade de fezes eliminadas no modelo de diarreia induzida por óleo de rícino em camundongos.....	58
6 Efeito do látex do <i>Croton urucurana</i> (LCU) sobre a perda de peso corpóreo apresentada pelos animais no modelo de diarreia induzida por óleo de rícino em camundongos.....	60
7 Efeito da administração oral do látex do <i>Croton urucurana</i> (LCU) sobre o trânsito gastrintestinal de camundongos.....	64
8 Efeito da naloxona sobre a atividade do látex do <i>Croton urucurana</i> (LCU) no trânsito gastrintestinal de camundongos.....	66

9	Efeito da L-arginina sobre a atividade do látex do <i>Croton urucurana</i> (LCU) no trânsito gastrintestinal de camundongos.....	68
10	Efeito da ioimbina sobre a atividade do látex do <i>Croton urucurana</i> (LCU) no trânsito gastrintestinal de camundongos.....	70
11	Efeito do látex do <i>Croton urucurana</i> (LCU) sobre o trânsito gastrintestinal estimulado por fisostigmina em camundongos.....	73
12	Efeito do látex do <i>Croton urucurana</i> (LCU) e da clorpromazina sobre a secreção intestinal induzida pela toxina da cólera em camundongos.....	76
13	Efeito do látex do <i>Croton urucurana</i> (LCU) sobre as contrações induzidas por agonistas em jejuno isolado de rato <i>in vitro</i>	79

Lista de Figuras

Figura		Página
1	“Sangre de Grado”	27
2	<i>Croton urucurana</i> Baill.....	30
3	Folha do <i>Croton urucurana</i> Baill.....	31
4	Flores e frutos do <i>Croton urucurana</i> Baill.....	32
5	Efeito do látex do <i>Croton urucurana</i> (LCU) sobre a fluidez das fezes no modelo de diarreia induzida por óleo de rícino em camundongos.....	57
6	Efeito do látex do <i>Croton urucurana</i> (LCU) sobre a quantidade de fezes (g) eliminada por quilo de peso corpóreo dos animais no modelo de diarreia induzida por óleo de rícino em camundongos..	59
7	Efeito do látex do <i>Croton urucurana</i> (LCU) sobre a perda de peso corpóreo apresentada pelos animais no modelo de diarreia induzida por óleo de rícino em camundongos.....	61
8	Efeito da administração oral do látex do <i>Croton urucurana</i> (LCU) sobre o trânsito gastrointestinal de camundongos.....	65
9	Efeito da naloxona sobre a atividade do látex do <i>Croton urucurana</i> (LCU) no trânsito gastrointestinal de camundongos.....	67
10	Efeito da L-arginina sobre a atividade do látex do <i>Croton urucurana</i> (LCU) no trânsito gastrointestinal de camundongos.....	69

11	Efeito da ioimbina sobre a atividade do látex do <i>Croton urucurana</i> (LCU) no trânsito gastrointestinal de camundongos.....	71
12	Efeito do látex do <i>Croton urucurana</i> (LCU) sobre o trânsito gastrointestinal estimulado por fisostigmina em camundongos.....	74
13	Efeito do látex do <i>Croton urucurana</i> (LCU) e da clorpromazina sobre a secreção intestinal induzida pela toxina da cólera em camundongos.....	77
14	Efeito do látex do <i>Croton urucurana</i> (LCU) sobre as contrações induzidas por agonistas em jejuno isolado de rato <i>in vitro</i>	80

Lista de Abreviaturas

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
AMPc	Monofosfato de Adenosina Cíclico
ANOVA	Análise de Variância
Baill.	Baillon
°C	Grau (s) centígrado (s)
cm	Centímetros
D	Receptor da dopamina
DL ₅₀	Dose Letal 50%
E.P.M.	Erro Padrão da Média
Fisost	Fisostigmina
g	Grama (s)
h	Hora (s)
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
5-HT	5-hidroxitriptamina
IL	Interleucina
i.p.	Intraperitoneal
KDa	Quilodalton (s)
kg	Quilograma (s)
LCU	Látex do <i>Croton urucurana</i> Baill.
L-NMMA	N ^W -Monometil-L-Arginina
L-NAME	L-Nitro Arginina Metil Éster
M	Molar
mg	Miligramas
min	Minuto (s)
mL	Mililitro (s)
mM	Milimolar
n	Número
N	Normal
NK	Neurocinina (receptor para as taquicininas)
NO	Óxido Nítrico

NOS	Óxido Nítrico Sintase
PAF	Fator Ativador de Plaquetas
pH	Potencial de hidrogênio
PM	Peso molecular
p.o.	<i>Per os</i> (via oral)
s.c.	Subcutâneo
SCU	Sap extracted from <i>C. urucurana</i> (látex do <i>C. urucurana</i>)
seg.	Segundos
SNC	Sistema Nervoso Central
TNF	Fator de Necrose Tumoral
VIP	Peptídeo Intestinal Vasoativo
v.o.	Via Oral
µg	Micrograma (s)
%	Porcentagem

RESUMO

AVALIAÇÃO EXPERIMENTAL DA ATIVIDADE ANTIDIARRÉICA DO LÁTEX DO *CROTON URUCURANA* BAILL. Luilma Albuquerque Gurgel. Orientador: Prof. Dr. Vietla Satyanarayana Rao. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Departamento de Fisiologia e Farmacologia. Faculdade de Medicina. Universidade Federal do Ceará, 2000.

O látex vermelho (Dragon's Blood ou Sangre de Grado) extraído de algumas espécies de *Croton* é utilizado na medicina popular no tratamento de câncer, reumatismo, feridas, úlceras, diarreia e também no combate a infecções. O presente trabalho tem por objetivo geral avaliar uma possível atividade antidiarréica do látex do *Croton urucurana* Baill. (LCU), bem como esclarecer os possíveis mecanismos de ação envolvidos nesta atividade, de modo a explicar e justificar o uso popular desta planta no tratamento da diarreia. Foram utilizados os modelos de diarreia induzida por óleo de rícino em ratos e camundongos, trânsito gastrointestinal e secreção intestinal induzida pela toxina da cólera em camundongos, e contrações induzidas por agonistas (acetilcolina, cloreto de bário e 5-HT) em jejuno isolado de rato. A administração oral do LCU (400, 600 e 800 mg/kg) produziu significativa atividade antidiarréica. Contudo, no modelo de diarreia induzida por óleo de rícino em ratos, L-arginina (600 mg/kg, i.p.) e naloxona (2 mg/kg, s.c.) não foram capazes de reverter a atividade antidiarréica do LCU (800 mg/kg, v.o.). No modelo de trânsito gastrointestinal, o LCU produziu uma inibição significativa do mesmo ($p < 0,01$) em todas as doses utilizadas. Porém, naloxona (2 mg/kg, s.c.), L-arginina (600 mg/kg, i.p.) e ioimbina (1 mg/kg, i.p.) falharam em reverter, de forma significativa, o efeito inibitório do LCU sobre o trânsito gastrointestinal. No modelo de trânsito gastrointestinal estimulado por fisostigmina (0,25 mg/kg, i.p.), o LCU (600 mg/kg, v.o.) não foi capaz de inibir o mesmo de forma significativa, indicando a ausência de uma ação anticolinérgica. O LCU (600 mg/kg) inibiu a secreção intestinal induzida pela toxina da cólera e esta inibição foi maior que aquela mostrada pela clorpromazina (25 mg/kg, v.o.), uma droga conhecida por seu efeito anti-secretório. No modelo de jejuno isolado de rato, o LCU inibiu de forma marcante as contrações induzidas por 5-HT, enquanto falhou em alterar as contrações induzidas pelos outros dois agonistas, cloreto de bário e acetilcolina. O LCU demonstrou baixa toxicidade, a DL_{50} (dose letal para 50% dos animais) encontrada foi de $5,20 \pm 0,13$ g/Kg, por via oral. Em conclusão, os resultados obtidos em nosso estudo sugerem que o látex do *Croton urucurana* Baill. apresenta atividade antidiarréica, confirmando seu uso popular, podendo ser explorado como uma alternativa para o tratamento da diarreia, sozinho ou em combinação com a solução de reidratação oral. Muito embora seu mecanismo de ação ainda não seja claro, seu efeito é independente da participação de mecanismo opióide, colinérgico, α_2 -adrenérgico ou nitriérgico.

Introdução

INTRODUÇÃO

1. GRAVIDADE DAS DOENÇAS DIARRÉICAS

Snyder & Merson (1982) realizaram a primeira estimativa global da grandeza do problema das doenças diarréicas.

As doenças diarréicas estão entre as causas de mortalidade de maior prevalência em países em desenvolvimento (Bern et al., 1992). No tratamento da diarréia secretória, a terapia de reidratação oral exerce importante papel e é eficiente em mais de 90 % dos casos com leve a moderada desidratação. Estudos da Organização Mundial de Saúde têm demonstrado que a terapia de reidratação oral é efetiva no tratamento das diarréias (Martinez et al., 1988).

O excesso de perda de água e eletrólitos nas fezes pode levar à desidratação, hiponatremia e hipocalemia. A cada ano a diarréia é responsável pela morte de pelo menos 3,5 milhões de crianças com menos de 5 anos de idade em todo o mundo (Mathan, 1998). A morte ocorre no estágio agudo, em consequência da desidratação, complicada também pela tão prevalente desnutrição.

A diarréia causada por enterotoxinas (*Vibrio cholerae* e *Escherichia coli*) ainda é uma das maiores causas de morbidade e mortalidade em muitos países tropicais (Bern et al., 1992). Estas toxinas parecem funcionar estimulando a secreção transepitelial de cloro pelas células da cripta, aumentando desse modo a secreção de fluido por seu efeito osmótico (Clarke et al., 1992).

A estratégia da reidratação utilizando a habilidade do intestino delgado de absorver água e sal durante a absorção da glicose, até mesmo em pacientes com cólera, pode reduzir significativamente a mortalidade, mas não a morbidade, dos casos de diarreia aguda (Mathan, 1998). Nestes casos, os medicamentos que reduzem a secreção e/ou estimulam a absorção podem ser valiosos.

No Nordeste do Brasil, mesmo com o uso da solução de reidratação oral, a diarreia persistente associada à desnutrição aguda continua sendo a principal causa de morbidade e mortalidade infantil (Guerrant et al., 1983 e 1992). A desnutrição predispõe a criança a uma maior incidência e duração da diarreia, assim como a uma maior incidência de diarreia persistente (Lima et al., 1992). A diarreia persistente é um problema, dentro do quadro das doenças diarreicas, que vem se agravando (Lima et al., 2000).

Muitos fatores podem ser responsáveis pelo aparecimento da diarreia, incluindo agentes infecciosos, toxinas, ansiedade, medicamentos etc.

A diarreia é um evento adverso relativamente freqüente, contabilizando cerca de 7 % das reações adversas de todas as drogas. Mais de 700 drogas têm sido apontadas como causadoras de diarreia, aquelas mais freqüentemente envolvidas são antimicrobianos, laxativos, antiácidos contendo magnésio, produtos contendo lactose ou sorbitol, antiinflamatórios não-esteroidais, prostaglandinas, colchicina, antineoplásicos, drogas antiarrítmicas e agentes colinérgicos (Chassany et al., 2000). Além disso, a diarreia é um sinal presente em muitas patologias, como a AIDS por exemplo, onde a prevalência da diarreia é de aproximadamente 50 % (Bouchaud, 1996).

2. DIARRÉIA

A diarreia é definida como um aumento no número de evacuações (3 ou mais/24h), um aumento na fluidez das fezes e/ou a presença de sangue e muco nestas (Mathan, 1998). A presença de sangue nas fezes é caracterizada como desinteria.

A diarreia é um sinal proveniente do aumento da secreção da mucosa gastrointestinal em resposta a diversos estímulos e/ou do aumento da motilidade intestinal. O aumento da secreção aumenta a quantidade de água e a fluidez das fezes. Se a doença primária causa inflamação ou ulceração da mucosa intestinal, particularmente do intestino grosso e reto, sangue e muco podem também estar presentes nas fezes. Uma grande variedade de condições, incluindo infecções entéricas, alteração na digestão e absorção dos alimentos, uma variedade de fatores hormonais ou mesmo uma resposta a infecção parenteral pode resultar no sintoma da diarreia.

A viscosidade do bolo fecal depende basicamente da absorção de água e da intensidade da propulsão intestinal. Na presença da diarreia observa-se uma redução da absorção ou uma hipersecreção de água juntamente com um aumento da motilidade intestinal que reduz a solidez das fezes. Esta mudança no fluxo de água é devido a um aumento na secreção de Cl^- ou HCO_3^- e uma inibição na absorção de Na^+ e Cl^- (Field & Semrad, 1993). Para que uma droga seja considerada antidiarréica, esta deve produzir um efeito inverso ao presente na diarreia, ou seja, ela deve reduzir a secreção (ou aumentar a absorção) intestinal de água e/ou reduzir a motilidade intestinal.

A diarreia de causa infecciosa é uma doença comum que afeta milhões de pessoas anualmente. A doença é autolimitada e constitui uma causa importante de morbidade entre as crianças. Seu maior risco é a desidratação.

A maioria dos patógenos gastrintestinais é transmitida por alimentos ou bebidas contaminadas com material fecal. A exposição pode, então, ser reduzida através da eliminação sanitária do lixo, ingestão de água limpa e lavagem das mãos, além do cozimento dos alimentos. Quando há falta de higiene, ocorrem as doenças diarreicas (Crawford, 1996).

Um grande número de organismos têm sido associados aos casos de diarreia em humanos, como por exemplo a *Salmonella*, *Shigella* e *Campylobacter*. Outras bactérias, parasitas e vírus contribuem para um significativo percentual de causas da diarreia. Muitos patógenos entéricos causam doenças, ou estimulando a secreção de fluidos no intestino delgado, ou irritando e invadindo o cólon.

A resistência de algumas bactérias a antibióticos tem crescido, e isto tem um efeito limitante sobre as escolhas de tratamento disponíveis para casos de suspeita de diarreia bacteriana (Goodman & Segreti, 1999).

A diarreia viral é causada pela diminuição da absorção de sódio e água através da luz intestinal, ao contrário das diarreias bacterianas mediadas por toxinas que são causadas por um aumento da secreção das células epiteliais do hospedeiro (Crawford, 1996).

As bactérias enteropatogênicas causam doença gastrointestinal por vários mecanismos: (1) enquanto crescem no alimento contaminado, certas cepas de estafilococos liberam enterotoxinas poderosas que, quando ingeridas, causam

sintomas de intoxicação sem qualquer multiplicação bacteriana no trato gastrointestinal; (2) o *Vibrio cholerae* e a *Escherichia coli* toxigênica multiplicam-se dentro da mucosa que recobre o epitélio gastrointestinal e liberam exotoxinas que fazem com que o epitélio intestinal secrete volumes excessivos de líquido levando a diarreia aquosa; (3) pelo contrário, a *Salmonella*, a *Shigella* e o *Campylobacter* invadem e lesam a mucosa intestinal e a lâmina própria, causando ulceração, inflamação e hemorragia, que clinicamente se manifestam como disenteria; (4) a *Salmonella typhi* passa pela mucosa lesada para a corrente sangüínea, resultando em infecção sistêmica.

Os *Vibrio cholerae* são bactérias Gram-negativas em forma de vírgula que causaram várias epidemias de longa duração (pandemias) de doença diarreica, a última durante os anos de 1961 a 1974 (Crawford, 1996).

O *Clostridium difficile* produz uma enterotoxina, toxina A (308 KDa), e uma citotoxina, toxina B (279 KDa), que causam diarreia e colite em humanos e animais experimentais (Kelly et al., 1994; Pothoulakis, 1996). Estudos recentes apontaram um importante papel da IL-1 β , TNF- α , prostaglandinas e PAF na secreção intestinal de água e eletrólitos induzida pela toxina A (Rocha et al., 1998).

A disenteria refere-se à diarreia acompanhada de dor abdominal e tenesmo, na qual as fezes eliminadas contêm sangue, pus e muco. A disenteria bacilar, que resulta em pelo menos 500.000 mortes por ano entre crianças nos países em desenvolvimento, é causada pela *Shigella dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* e *S. sonnei*, bem como por certas *E. coli* enterotóxicas do tipo O (Crawford, 1996). As espécies de *Shigella* infectam apenas humanos e têm transmissão fecal-oral.

A infecção por espécies de *Campylobacter* ocorre por ingestão, em geral, de líquidos ou alimento sólido contaminados, tais como leite, galináceos ou água. As epidemias são geralmente modestas, afetando crianças e adultos.

A *Yersinia enterocolítica* e a *Y. pseudotuberculosis* envolvem com mais frequência o íleo e o cólon distais, embora possam causar faringite e amigdalite.

A infecção fúngica do trato gastrointestinal ocorre principalmente nos pacientes imunologicamente comprometidos. A *Candida* demonstra uma predileção pelo epitélio escamoso estratificado, causando aftas orais ou esofagite membranosa, mas pode também disseminar-se para o estômago, trato gastrointestinal inferior e órgãos sistêmicos.

Os protozoários intestinais, como por exemplo a *Entamoeba histolytica* e a *Giardia lamblia*, disseminam-se através da via fecal-oral.

2.1. Classificação da Diarréia

A classificação clínica da diarréia é baseada na duração da mesma. A diarréia aguda é geralmente autolimitada e tem duração menor que duas semanas. A diarréia que persiste por 14 dias ou mais é classificada como diarréia persistente e, se a duração dos sintomas é maior que um mês, a diarréia é classificada como crônica (Mathan, 1998).

Mandell et al., em 1992, classificaram as infecções gastrointestinais da seguinte forma: diarréia inflamatória aguda, diarréia não-inflamatória aguda, diarréia dos viajantes, colite associada a antibioticoterapia e spru tropical.

2.1.1. Diarréia Infecciosa Aguda

- Definição

A diarréia infecciosa aguda é definida como uma diarréia acompanhada de infecção intestinal por um patógeno entérico conhecido (vírus, bactéria, parasita ou fungo). Os patógenos que causam a infecção diarreica aguda são divididos em organismos invasivos e não invasivos. É aceito que organismos não invasivos produzem diarréia aquosa, usualmente através de uma enterotoxina afetando primeiramente o intestino delgado. Os organismos invasivos por sua vez, afetam primeiramente o intestino grosso, invadem a mucosa e produzem uma resposta inflamatória e fezes sanguinolentas ou mucóides.

- Epidemiologia

A prevalência de afecções gastrointestinais difere entre países desenvolvidos e em desenvolvimento devido às precárias condições de saneamento e higiene, impureza da água, analfabetismo e pobreza nos países em desenvolvimento (Dhawan & Desai, 1996). Amostra de fezes de humanos assintomáticos e aparentemente sadios pertencentes a países tropicais em desenvolvimento mostraram a presença de patógenos entéricos (Rajan & Mathan, 1986). Em contraste, em países industrializados de zonas temperadas, são raramente encontrados patógenos entéricos nas amostras de fezes de indivíduos assintomáticos. A prevalência de colonização entérica por agentes patógenos no trato gastrintestinal de humanos assintomáticos habitantes de países tropicais em desenvolvimento é um reflexo da contaminação ambiental, suprimento inadequado de água e péssimas condições de higiene.

A incidência de diarreia aguda em zonas tropicais e temperadas é similar, porém a morbidade e mortalidade associadas aos casos de diarreia são bem diferentes. Esta diferença é influenciada pelo estado nutricional, fatores sócio-econômicos e acesso a assistência médica.

Epidemias de diarreia infecciosa aguda ocorrem frequentemente em regiões tropicais. Muitas dessas epidemias são confirmadas em pequenas áreas geográficas circunscritas e são usualmente relativas a contaminação de água ou, raramente, comida.

- Agentes Etiológicos

A prevalência de diferentes agentes etiológicos difere de uma área para outra.

As chances de identificar o agente etiológico da diarreia infecciosa aguda aumentam com a variedade e complexidade das técnicas de identificação utilizadas. Contudo, o número de agentes etiológicos (vírus, bactérias, parasitas e fungos) está sempre aumentando.

Enquanto a identificação destes agentes pode ajudar a entender melhor a epidemiologia e patogênese da diarreia infecciosa aguda, esta pouco contribui para a prevenção ou tratamento do paciente, especialmente no que diz respeito a antibioticoterapia, uma vez que esta não pode esperar pelo resultado da cultura.

- Patogênese

Um dos problemas no estudo da patogênese da diarreia tem sido a carência de modelos animais de diarreia infecciosa aguda. Alguns patógenos entéricos não produzem diarreia em animais.

Os mecanismos que levam ao aparecimento da diarreia dependem de fatores do agente patógeno e das respostas complexas do hospedeiro. Os fatores microbianos mais bem compreendidos até o presente momento são as enterotoxinas e a invasão da mucosa (Mathan, 1998).

A cólera é o exemplo mais típico de diarreia induzida por enterotoxina. A toxina da cólera tem duas subunidades, a subunidade A ativa está ligada covalentemente a cinco subunidades B que são essenciais para a toxina se ligar ao seu receptor, gangliosídeo GM₁ na superfície das células epiteliais (superfície da membrana dos enterócitos e colonócitos). Após a ligação, a subunidade A é internalizada e através de uma complexa cascata envolvendo proteínas G_s (Field, 1971; Kimberg et al., 1971) e proteínas cinases, ocorre ativação persistente da adenilato ciclase. Como consequência do dramático aumento nos níveis de AMPc no interior das células, um canal de Cl⁻ na membrana apical é ativado resultando em volumosa secreção de cloro e perda associada de sódio e água (Field, 1971; Clarke et al., 1992; Mathan, 1998).

O mecanismo de invasão da célula epitelial foi melhor estudado utilizando a *Shigella flexneri* (Sansonetti, 1991). A invasão do epitélio e da mucosa gera inflamação, ulceração e exsudação (escape de um líquido rico em proteínas para o interstício).

Enterotoxinas e enteroinvasão explicam apenas uma parte dos casos de diarreia infecciosa aguda. Um grande número de agentes, que nem secretam enterotoxinas conhecidas, nem invadem a mucosa, ainda são aceitos como agentes causadores de diarreia (Mathan, 1998).

- Tratamento clínico

O tratamento clínico da diarreia infecciosa aguda é baseado na correção da desidratação, na conservação da nutrição, no tratamento das complicações e no uso apropriado de antibióticos. Na maioria dos pacientes a desidratação pode ser corrigida através da administração oral de uma solução contendo água com sal e açúcar (Avery & Snyder, 1990).

Há mais de duas décadas a Organização Mundial de Saúde tem recomendado a solução de reidratação oral. Esta solução tem se mostrado bastante efetiva na prevenção e no tratamento da desidratação causada pela diarreia e tem contribuído substancialmente para o salvamento de vidas em países em desenvolvimento. Contudo, a terapia de reidratação oral usando esta solução não reduz o volume das fezes nem a frequência de defecação. Durante os últimos 16 anos vários estudos têm sido realizados na tentativa de desenvolver uma solução de reidratação oral que possa, além de tratar e prevenir a desidratação, reduzir a severidade e a duração da diarreia (Mahalanabis, 1996).

Foi demonstrado que os agentes antiinflamatórios não-esteróides, tais como aspirina e indometacina, exercem ações antidiarréicas significativas, tanto em animais experimentais, quanto no homem. O efeito é devido, provavelmente, em grande parte, à inibição da síntese das prostaglandinas, embora possam desempenhar algum papel outros mecanismos ainda desconhecidos (Rang et al., 1997).

O maleato de zaldarida, que é um preparado recente e ainda não está amplamente disponível, inibe a calmodulina e, conseqüentemente, reduz a secreção

de água e eletrólitos (Rang et al., 1997). Este foi relatado como eficaz na diarreia dos viajantes (Okhuysen et al., 1995; Silberschmidt et al., 1995).

2.1.2. Diarreia do Viajante

A diarreia do viajante é o resultado à exposição do trato gastrintestinal a patógenos entéricos em um ambiente diferente (Mathan, 1998).

Mais de cinquenta por cento das pessoas que viajam de regiões temperadas para regiões tropicais ou subtropicais apresentam diarreia. A *Escherichia coli* é a causa mais freqüente dessas diarreias, sendo identificada em 40 a 70 % dos casos (Chagnon, 1996).

2.1.3. Diarreia Persistente

A diarreia persistente é definida como um episódio de diarreia infecciosa aguda com duração de 14 dias ou mais (Black, 1993). Afeta predominantemente crianças com menos de três anos de idade e ocorre em 3 - 21 % dos casos de diarreia. A diarreia persistente é importante porque sua etiologia ainda não é clara, seu tratamento é difícil, afeta o estado nutricional e aumenta os riscos de morte (González et al., 1995). Quando a diarreia persistente se instala, o desenvolvimento ou agravamento da desnutrição ocorre facilmente e um ciclo vicioso de estado nutricional prejudicado e diarreia pode se estabelecer, existindo um risco substancial de morte (Guerrant et al., 1992). Crianças apresentando diarreia persistente

necessitam de atenção redobrada para prevenir outros episódios de diarreia e deficiências no crescimento (Guerrant et al. *apud* Lima et al., 2000).

2.1.4. Diarreia Crônica

A diarreia crônica é definida como diarreia prolongada por períodos superiores a um mês. Uma abordagem clínica divide a diarreia crônica em síndromes de má-absorção (por exemplo, espru tropical), diarreia crônica sem má-absorção (por exemplo, síndrome do intestino irritável) e diarreia crônica do imunodeficiente. O espru tropical tem essa denominação porque ocorre quase exclusivamente nas pessoas que vivem nos trópicos ou que visitam esta região (Mathan, 1988).

3. MEDICAMENTOS UTILIZADOS NO TRATAMENTO DA DIARRÉIA

As drogas antidiarréicas reduzem a sintomatologia da diarreia como a perda da consistência das fezes e o aumento da frequência de defecação e da massa fecal. Sua ação é produzida através de efeitos sobre o trânsito intestinal, o transporte da mucosa, ou o conteúdo da luz intestinal.

As drogas usadas atualmente no tratamento da diarreia, como opiáceos e antibióticos, têm suas limitações, devido ao desenvolvimento de resistência bacteriana ao uso de antibióticos e ao aparecimento, por vezes, de constipação com o uso de opiáceos. Desse modo, estudos vêm sendo realizados na tentativa de encontrar drogas que atuem predominantemente na secreção sem afetar a

motilidade gastrointestinal, reduzindo deste modo a fluidez das fezes sem contudo causar constipação. Recentes avanços terapêuticos incluem antagonistas do receptores 5-HT₂ e 5-HT₃, antagonistas do sistema cálcio-calmodulina, agonistas dos receptores opióides sigma e o inibidor da encefalinase, racecadotril (Farthing, 2000).

Os opióides são os agentes antidiarréicos mais utilizados e apresentam efeitos sobre o trânsito, a absorção e a secreção intestinal. Os agonistas α -adrenérgicos, os análogos da somatostatina e alguns outros agentes têm uso limitado e podem modificar o transporte da mucosa, além de lentificar o trânsito. Adsorventes, bismuto e os agentes que modificam o transporte de líquidos e eletrólitos, como o maleato de zaldarida, são freqüentemente utilizados. As soluções de reidratação oral têm tido grande importância no salvamento de vidas e continuam sendo utilizadas. Contudo, novos métodos para o tratamento da diarreia ainda estão sendo explorados (Schiller, 1995).

4. MEDICAMENTOS QUE ALTERAM O TRÂNSITO INTESTINAL

Várias são as queixas que podem ser apresentadas pelo paciente frente a alterações no funcionamento normal do intestino, dentre elas podemos citar diarreia, perda de peso, endurecimento das fezes, cólica abdominal, urgência fecal e constipação. Os medicamentos que alteram o trânsito intestinal são indicados de acordo com a sintomatologia apresentada pelo paciente. Por exemplo, existem drogas que aliviam a constipação ou funcionam como laxantes, enquanto outras apresentam atividade antidiarréica.

Existem medicamentos utilizados para aumentar ou diminuir a motilidade do intestino. Os medicamentos que aumentam os movimentos incluem os purgativos, que aceleram a passagem do alimento através do intestino, e os agentes que aumentam a motilidade da musculatura lisa intestinal sem causar purgação.

Não existem bons estudos clínicos comparativos acerca dos laxativos, porém, existem quatro diferentes métodos que podem ser utilizados para acelerar o trânsito do alimento através do intestino (Rang et al., 1997), são eles:

- aumentando o volume de massa fecal, com laxativos formadores de massa, como a metilcelulose e certas resinas vegetais, que não são desintegradas pelo processo normal de digestão e agem retendo água na luz intestinal, promovendo, assim, a peristalse.
- aumentando o conteúdo hídrico, com laxativos osmóticos, como o sulfato de magnésio, o hidróxido de magnésio e a lactulose. Existem evidências da participação do NO (Izzo et al., 1994) e do PAF (Capasso et al., 1993) na atividade laxativa do sulfato de magnésio.
- alterando a consistência das fezes, com emolientes fecais, como o docusato de sódio, que age como um detergente e produz fezes mais moles.
- aumentando a motilidade e a secreção, com purgativos irritantes ou estimulantes, como o bisacodil, a fenolftaleína, a cáscara sagrada, o aloes, o óleo de rícino, o picossulfato de sódio e preparados da sene, que agem acelerando a peristalse.

Os principais grupos de medicamentos utilizados para aumentar a motilidade gastrointestinal são: a domperidona, a metoclopramida e a cisaprida.

A domperidona é um antagonista dos receptores da dopamina (D_2) e é usada também como antiemético. Ela eleva a pressão no esfíncter esofágico inferior, aumenta o esvaziamento gástrico e a peristalse duodenal. Admite-se que a domperidona acelera a motilidade por bloquear os α_1 -adrenoceptores (Rang et al., 1997).

A metoclopramida também é um antagonista dos receptores dopaminérgicos. Além de seus efeitos centrais como antiemético exerce ações periféricas aumentando a motilidade do estômago e do intestino. Acredita-se que ativa os neurônios colinérgicos (Rang et al., 1997).

A cisaprida estimula a liberação de acetilcolina no plexo mioentérico e no trato gastrointestinal superior. Isso eleva a pressão do esfíncter esofágico e aumenta a motilidade intestinal (Rang et al., 1997).

Os principais agentes que reduzem a motilidade gastrointestinal são os antidiarréicos e os antiespasmódicos.

Os agentes antidiarréicos incluem os agentes antimotilidade, os adsorventes e os agentes que modificam o transporte dos líquidos e dos eletrólitos.

Os principais agentes que reduzem a motilidade são os opiáceos e os antagonistas dos receptores muscarínicos. Os agentes deste último grupo são usados raramente devido às suas ações sobre outros sistemas, como o sistema cardíaco, por exemplo, podendo causar taquicardia. Os opióides são os agentes antidiarréicos mais utilizados (Schiller, 1995).

A morfina tem um complexa ação sobre o trânsito gastrointestinal. No homem ela eleva o tônus e as contrações rítmicas do intestino, mas reduz a atividade propulsiva, tendo efeito constipante. Os esfíncteres pilórico, ileocólico e anal ficam contraídos, e o tônus do intestino grosso sofre aumento acentuado (Rang et al., 1997).

Os principais opiáceos utilizados nos casos de diarréia são codeína, difenoxilato e loperamida. A codeína e a loperamida exercem ações anti-secretórias, além de efeitos sobre a motilidade intestinal. Todos podem apresentar efeitos indesejáveis que incluem náuseas, vômitos, cólicas abdominais, sonolência, vertigens e íleo paralítico (Rang et al., 1997).

Os adsorventes são amplamente utilizados apesar de não terem sido realizados ensaios devidamente controlados para comprovar sua adequação. Os principais preparados usados são caulim, pectina, greda, carvão vegetal, metilcelulose e atapulgia ativada (silicato de magnésio e alumínio).

Dentre os agentes que modificam o transporte de líquidos e eletrólitos está o maleato de zaldarida, já comentado anteriormente, que é um preparado recente. Ele inibe a calmodulina e, conseqüentemente, reduz a secreção de água e eletrólitos (Okhuysen et al., 1995; Silberschmidt et al., 1995). Outros preparados com o potencial de produzir estes efeitos foram testados em laboratório e estão sendo investigados no homem.

Desde a descoberta das encefalinas, em 1975, tem estado claro que essas desempenham um papel anti-secretório no trato gastrointestinal. Conseqüentemente um programa de pesquisa foi realizado na tentativa de descobrir uma droga que

pudesse preservar estes neurotransmissores no intestino prevenindo a sua inativação. Este programa de pesquisa resultou no desenvolvimento do inibidor da encefalinase, racecadotril. Schwartz (2000), mostrou a eficácia do racecadotril em dois modelos de diarreia secretória, utilizando toxina da cólera e óleo de rícino. Contudo, o racecadotril não foi capaz de reduzir a motilidade gastrintestinal. Esta droga tem demonstrado boa eficácia e tolerabilidade em ensaios clínicos (Farthing, 2000).

Os agentes antiespasmódicos são valiosos na síndrome do intestino irritável e na doença diverticular.

Os antagonistas dos receptores muscarínicos reduzem o espasmo por inibirem a atividade parassimpática. Os efeitos indesejáveis, que ocorrem devido à inibição parassimpática em outros tecidos, incluem: boca seca, visão turva, pele seca, taquicardia e dificuldade em urinar.

5. A CÓLERA

O *Vibrio cholerae* tem um período de incubação entre algumas horas a 5 dias. O contágio é feito pela via fecal-oral, ocorrendo em geral em pandemias. Ele produz fezes aquosas e desidratação rápida, que é a causa da morte. O paciente pode também vomitar e ficar febril. O diagnóstico é feito pela microscopia direta e cultura. O paciente deve ficar sob estreita vigilância da enfermagem, e as perdas de sal e líquidos devem ser repostas de modo meticuloso.

A 5-HT é um importante mediador da secreção intestinal induzida pela toxina da cólera (Beubler & Horina, 1990). Além da 5-HT, também estão envolvidos na patogênese da cólera o AMPc, prostaglandinas e a função de estruturas neuronais.

Segundo estudos realizados por Beubler & Horina (1990), utilizando jejuno de rato *in vivo*, parece que a toxina da cólera pode desencadear a liberação de 5-HT pelas células enterocromafins. Os autores supõem que a 5-HT pode então causar a formação de prostaglandina E₂ via receptores 5-HT₂ e a ativação de estruturas neuronais via receptores 5-HT₃. Estes dois efeitos podem finalmente levar a uma abundante secreção de fluido.

Peterson et al. (1993) também estudaram os mediadores envolvidos no aumento da secreção intestinal induzido pela toxina da cólera e concluíram que a toxina da cólera estimula a síntese e a liberação tanto de AMPc, quanto de prostaglandina E₂, e ainda que o AMPc parece causar a liberação de 5-HT pelas células cromafins.

Estudos recentes realizados por Peregrin et al. (1999 e 1997) concluíram que a secreção intestinal induzida pela toxina da cólera é atenuada ou abolida por bloqueadores dos canais de cálcio do tipo L ou N e que a atividade anti-secretória intestinal dos bloqueadores dos canais de cálcio do tipo L é, em parte, explicada pela inibição da liberação de 5-HT induzida pela toxina da cólera.

O NO também parece estar envolvido na secreção intestinal induzida pela toxina da cólera. Janoff et al. (1997) concluíram em seus estudos que a infecção sintomática de humanos pelo *V. cholerae* induz a produção de NO e que, em modelo de alça ileal de coelho, a toxina da cólera estimula significativamente a produção de

NO em associação com o aumento na atividade local de NOS Ca^{2+} -dependente. A toxina da cólera também estimula a secreção intestinal por outros mecanismos como a estimulação da citocina pró-inflamatória IL-6 (McGee et al., 1993), VIP (Nilson et al., 1983; Jiang et al., 1993) e pela promoção da permeabilidade intestinal (Triadafilopoulos et al., 1989).

6. O ÓLEO DE RÍCINO

O óleo de rícino é um laxativo efetivo (Gaginella & Bass, 1978). A diarreia induzida por ele é atribuída ao seu princípio ativo, o ácido ricinoléico. O óleo de rícino é hidrolisado na parte superior do intestino delgado em ácido ricinoléico, um irritante local que produz diminuição da absorção e aumento da secreção, da motilidade e do trânsito intestinal (Menezes et al., 1994). O início de ação é imediato e prossegue até que o composto seja excretado pelo cólon. Vários mediadores parecem estar envolvidos na indução da diarreia pelo óleo de rícino.

O óleo de rícino produz seu efeito laxativo em associação com a liberação de prostaglandinas (Rachmilewitz et al., 1980; Autore et al., 1984; Capasso et al., 1986) e fator ativador de plaquetas (PAF) (Pinto et al., 1989 e 1992), aumento da permeabilidade da mucosa (Farack & Nell, 1984), injúria do epitélio (Saunders et al., 1977 e 1978) e outros efeitos não específicos. O AMP cíclico (AMPC) também parece estar envolvido na secreção intestinal como resposta ao ácido ricinoléico (Racusen & Bindes *apud* Mascolo et al., 1994). Além de prostaglandinas e PAF, existem evidências da participação de taquicininas (NK_1 e NK_2) na diarreia induzida por óleo de rícino (Crocì et al., 1997). Portanto, fica claro que a ação do óleo de

ricino como laxativo envolve uma complexa interação entre vários mediadores endógenos.

O PAF parece estar envolvido na atividade secretória do óleo de ricino, uma vez que foi mostrado que o antagonista do PAF, SR27417, reduz a incidência de diarreia induzida por óleo de ricino em ratos (Crocì et al., 1997). Tem sido mostrado que o PAF exerce uma série de efeitos sobre o intestino, incluindo contração da musculatura gastrointestinal e indução de erosões hemorrágicas da mucosa gastrointestinal (Campbell & Haluska *apud* Izzo et al., 1998) e ainda estimulação da secreção de ânions em modelos animais (Hinterleitner et al. *apud* Izzo et al., 1998).

Outro mediador possivelmente envolvido no efeito laxativo do óleo de ricino é o NO. Este estimula a secreção intestinal (MacNaughton et al., 1992 e 1993; Wilson et al., 1993) e relaxa a musculatura lisa gastrointestinal (Stark et al., 1991; Ward et al., 1992), este último efeito parece aumentar o trânsito intestinal e contribuir para um efeito laxativo (Gullikson & Bass *apud* Izzo et al., 1994). O NO está envolvido em alterações da motilidade intestinal induzida pelo óleo de ricino (ácido ricinoléico) tanto *in vitro* (Izzo et al., 1993) quanto *in vivo* (Mascolo et al., 1994).

A NOS é responsável pela geração de NO a partir da L-arginina (Moncada et al., 1991). Esta enzima existe na forma constitutiva e indutiva em muitos tecidos (Moncada et al., 1991; Langrehr et al., 1993). A musculatura intestinal de ratos e cães é inervada por neurônios que contêm NOS (Kostka et al., 1993; Nichols et al., 1993), o que dá mais um suporte ao possível papel do NO na regulação da motilidade e secreção intestinal.

Mascolo et al., em seus estudos sobre a influência do NO na motilidade intestinal, mostraram que o inibidor reversível da NOS, L-NAME (Rees et al., 1990), inibe a secreção intestinal de água e eletrólitos induzida por óleo de rícino em ratos (Mascolo et al., 1993 e 1994). Outro inibidor reversível da NOS, L-NMMA (Rees et al., 1990), previne ou reduz a diarreia induzida por óleo de rícino (Mascolo et al., 1993). Estes achados sugerem que o NO pode estar envolvido na atividade diarreica do óleo de rícino. Em modelos animais utilizando ratos tratados com óleo de rícino, o L-NAME exacerbou os danos causados no intestino sugerindo que o NO exerce uma atividade protetora sobre o intestino (Capasso et al. *apud* Izzo et al., 1998). Contudo, o fato do L-NAME bloquear o efeito diarreico do óleo de rícino ao mesmo tempo em que agrava a injúria à mucosa intestinal sugere que estes dois eventos não têm correlação de causa e efeito.

O NO estimula a guanilato ciclase intestinal (Ward et al., 1992). A elevação de GMP cíclico (GMPc) intracelular está associada com o relaxamento do músculo liso (Katsuki et al., 1977) e com a secreção intestinal (Brasitus et al., 1976).

Apesar do fato de inúmeros mecanismos terem sido propostos para o efeito laxativo do óleo de rícino, ainda não foi possível definir com clareza seu mecanismo de ação, contudo, ele tem sido uma boa ferramenta no estudo dos sintomas associados à diarreia (redução da consistência das fezes, aumento da frequência de defecação e eliminação excessiva de fezes).

7. O USO DE PLANTAS MEDICINAIS

O uso de espécies vegetais com fins de tratamento e cura de doenças e sintomas remonta ao início da civilização, no momento em que o homem despertou para o manuseio, adaptação e modificação dos recursos naturais visando a compreensão, dominação e uso em seu próprio benefício. Nascia dessa forma, há 60.000 anos, a fitoterapia.

Desde o início da cultura humana, as plantas têm sido utilizadas pelo homem com vários objetivos para sua sobrevivência, inclusive fins medicinais. O papiro de Ebers, espécie de farmacopéia faraônica escrita em torno de 1550 a.C., já se referia aos medicamentos de origem vegetal e mencionava cerca de 700 remédios, entre eles, o bulbo da cila, o óleo de rícino e a genciana.

O conhecimento sobre plantas medicinais simbolizava muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos.

Atualmente nas regiões mais pobres do país, plantas medicinais são encontradas em feiras livres, mercados populares, ou mesmo nos quintais das casas e são usadas de maneira empírica no combate a doenças. É conhecido que o aborígene sabe encontrar nas plantas lenitivo para suas dores; o sertanejo nas suas dificuldades utiliza inúmeros tipos diferentes de chás para combater febres, infecções ou mesmo picadas de cobra venenosa; os caboclos e indígenas da região Amazônica curam doenças com ervas e fazem uso de plantas contraceptivas e abortivas.

As observações populares contribuem de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas de vegetais que, embora não tenham conhecidos seus

constituintes químicos, são prescritos com frequência pelos efeitos medicinais que produzem. Esse tipo de cultura medicinal promove ilimitadamente o interesse de pesquisadores em estudos envolvendo áreas multidisciplinares, como por exemplo: botânica, farmacologia e fitoquímica, que juntas enriquecem os conhecimentos sobre a inesgotável fonte medicinal natural: a flora mundial.

Farnsworth et al. (1985), relatam que existem pelo menos 119 substâncias químicas obtidas de 91 espécies vegetais, que podem ser consideradas drogas de importância clínica atual. A aspirina®, por exemplo, originalmente foi extraída de uma planta, a *Salix alba* (daí o nome ácido acetilsalicílico), a morfina da papoula e o taxol, utilizado em pacientes com câncer de mama, foi produzido a partir de uma árvore chamada teixos.

A quinina, principal alcalóide derivado da casca da árvore cinchona, tem sido utilizada para a supressão e o tratamento da malária há mais de 300 anos. Durante o ano de 1959, a quinina foi superada por outros antimaláricos. Hoje, é usada principalmente para o tratamento oral da malária *falciparum* resistente à cloroquina e para o tratamento parenteral das crises graves de malária *falciparum*.

A ciência fitoterápica é amplamente utilizada por grande parte da população mundial como fonte de recurso terapêutico eficaz.

Dados mostram que somente 20 - 30 % da população mundial, que habita os países desenvolvidos, é responsável pelo consumo de 85 % dos medicamentos industrializados disponíveis no mercado (Farnsworth et al., 1985).

Estima-se que existam aproximadamente duzentas e cinquenta mil espécies de plantas, várias delas sob o perigo de extinção no próximo século.

Aproximadamente 20.000 espécies de plantas são utilizadas na medicina tradicional, sendo a maioria das espécies não avaliadas quimicamente ou farmacologicamente. No Brasil, apesar dos 40 anos de pesquisa de plantas medicinais, o número de espécies estudadas é muito reduzido (Souza Brito & Souza Brito, 1993). Estima-se que exista um total de 40-50 mil espécies vegetais; estes dados promovem o Brasil ao título: “o país que possui o maior número de espécies vegetais no mundo” (Farnsworth & Soejarto, 1991).

A pesquisa etnofarmacológica no Brasil constitui um grande desafio. Apesar de uma razoável base científica existente no país, existe ainda uma grande distância entre a pesquisa, o desenvolvimento e a comercialização de compostos bio-ativos.

8. PLANTAS MEDICINAIS USADAS NO TRATAMENTO DA DIARRÉIA

Muitas plantas são utilizadas na medicina popular como antidiarréicas (Caceres et al., 1990; Almeida et al., 1995). Estas contêm um número de substâncias químicas que exercem ações adstringente, antimicrobiana ou antiparasitária ajudando no controle da diarreia associada ao aumento da secreção e motilidade intestinal.

Muitas pessoas que sofrem com diarreia são indivíduos socialmente desprivilegiados e conseqüentemente quase não têm acesso à medicina alopática. Por esta razão alguns pesquisadores realizaram estudos na tentativa de determinar a eficácia de plantas popularmente usadas no tratamento da diarreia. Estudos realizados por Almeida et al. (1995) demonstraram potencial atividade antidiarréica do extrato aquoso bruto das folhas de *Psidium guajava* (goiabeira), *Stachytarpheta*

cayenensis (gervão), *Polygonum punctatum* (polígono ou pimenta d'água), *Eugenia uniflora* (pitangueira) e *Aster squamatus* (zé-da-silva) nos modelos de transporte intestinal de água em ratos e trânsito gastrintestinal em camundongos.

O extrato etanólico da casca da *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. (aroeira), usada popularmente no Brasil no controle da diarreia e outras desordens gastrintestinais (Cruz, 1982), também mostrou atividade antidiarréica no modelo de diarreia induzida por óleo de rícino em ratos, além de reduzir o trânsito intestinal e o acúmulo de fluido intestinal (Chaves et al., 1998). Os resultados obtidos por Menezes & Rao, em 1988, mostram que o extrato alcoólico da *Astronium urundeuva* inibe o trânsito gastrintestinal estimulado por fisostigmina, sugerindo que uma ação anticolinérgica da planta possa contribuir, em parte, por sua atividade antidiarréica.

Os flavonóides são compostos químicos naturais largamente encontrados no reino vegetal. Aproximadamente 3.000 tipos de flavonóides já foram identificados e novas estruturas estão sempre sendo descobertas e relatadas. Estas substâncias estão presentes nos vegetais em geral, frutos, grãos, caule, folhas e flores e são responsáveis pelas cores existentes na natureza (Hermann, 1976). Os flavonóides constituem o princípio ativo de muitas plantas medicinais utilizadas em várias partes do mundo. Certos flavonóides inibem a liberação de histamina, induzida por antígeno, de mastócitos e basófilos e também inibem a contração de íleo de cobaio induzida por histamina, acetilcolina e prostaglandina E₂ (Fanning et al., 1983).

Foi mostrado que a quercetina inibe as contrações de íleo de cobaio estimuladas por agonista ou por anafilaxia (Fanning et al., 1983). Outros flavonóides mostraram atividade semelhante (Middleton & Drzewiecki, 1984; Capasso et al., 1988 e 1991). A quercetina também inibiu a motilidade intestinal *in vivo* e este efeito

foi potenciado pelo verapamil (Meli et al., 1990), um bloqueador dos canais de cálcio, e antagonizado pela ioimbina e fentolamina, antagonistas α_2 -adrenérgicos, sugerindo que o cálcio e os receptores α_2 -adrenérgicos participam da inibição do trânsito intestinal induzida pelos flavonóides (Di Carlo et al., 1993).

Di Carlo et al., em 1993, avaliaram a atividade antidiarréica de 14 diferentes flavonóides e concluíram, em seus resultados, que 12 deles apresentaram atividade inibitória sobre o trânsito intestinal de camundongos e 11 deles inibiram a secreção de água e sódio estimulada pelo óleo de rícino em ratos.

A ternatina, uma tetrametoxiflavona isolada da *Egletes viscosa* Less., apresentou atividade inibitória sobre o trânsito gastrintestinal e a secreção intestinal induzida por óleo de rícino em camundongos, além de antagonizar as respostas contráteis provocadas por acetilcolina, histamina, serotonina (5-HT) e cloreto de bário em íleo de cobaio *in vitro* (Rao et al., 1997).

Plantas que contêm taninos em sua composição podem apresentar um efeito antidiarréico, uma vez que estas substâncias precipitam as proteínas dos enterócitos, reduzindo os movimentos peristálticos e a secreção intestinal (Almeida et al., 1995). A camada formada pelo precipitado de proteínas na superfície da mucosa dos enterócitos também inibe o desenvolvimento de microorganismos, explicando portanto a ação anti-séptica dos taninos, que contribui para o tratamento da diarreia (Costa *apud* Almeida et al., 1995).

9. O GÊNERO *CROTON*

O gênero *Croton* pertence a família *Euphorbiaceae*. A família *Euphorbiaceae* abrange cerca de 283 gêneros e 7.300 espécies distribuídas por quase todo o planeta. Os dois maiores centros de ocorrência são a América e a África. Quinze gêneros desta família têm mais de 100 espécies cada, e os maiores incluem *Euphorbia* (mais de 1.000 espécies), *Croton* (700 espécies), *Phyllanthus* (480 espécies), *Acalypha* (430 espécies), *Glochidion* (280 espécies), *Macaranga* (240 espécies), *Manihot* (160 espécies), *Jatropha* (150 espécies) e *Tragia* (140 espécies) (Farnsworth et al., 1969).

Estas 700 espécies pertencentes ao gênero *Croton* encontram-se distribuídas nas regiões tropicais do planeta. Algumas destas espécies, como o *Croton urucurana* Baillon, quando têm seu tronco cortado libertam um látex de cor vermelha (Figura 1) conhecido como “Sangre de Drago” (em inglês “Dragon’s Blood”) ou “Sangre de Grado” nomes espanhóis dados à planta pelos Europeus em sua chegada ao Novo Mundo, cinco séculos atrás. No Brasil, o látex é também conhecido como sangue-de-água, sangue-de-dragão ou sangue-de-pau. A origem do nome “Sangre de Drago” vem de algumas espécies do gênero *Dracaena* da família *Agavaceae*. Algumas das 60 espécies desse gênero também produzem um látex de cor vermelha quando seu tronco é cortado ou sofre alguma injúria (dando origem ao nome “Dragon’s Blood”). Uma dessas espécies, *Dracaena cinnabari* Balf., era provavelmente conhecida na antigüidade (Ubillas et al., 1994).

Este látex é um dos produtos naturais mais usados em toda a América Latina (Ubillas et al., 1994). Ele é tão utilizado na medicina popular que as árvores das quais ele é obtido encontram-se em perigo de extinção devido à demanda excessiva

em países como Peru e Equador (Phillipson, 1995). O látex tem sido utilizado por séculos e continua a ser usado por uma grande diversidade de pessoas, especialmente na Colômbia, Equador, Peru, Bolívia, Paraguai, México e América Central, sendo bastante comercializado no Peru e Equador (Meza *apud* Ubillas et al., 1994).

O látex vermelho (Dragon's Blood ou Sangre de Grado) é utilizado na medicina popular no tratamento de câncer, reumatismo, feridas, úlceras, diarreia e também no combate a infecções (Hartwell, 1969; Bettolo & Scarpati, 1979; Perdue et al., 1979; Itokawa et al., 1991; Ubillas et al., 1994). Ele é usado tanto internamente quanto externamente. A dosagem, baseada no uso indígena e no uso popular em algumas regiões da América do Sul, é de 5 a 30 gotas do látex diluídas em água, leite ou bebida alcoólica, de uma a três vezes ao dia, por cinco dias. Este tratamento é geralmente repetido por um período de três semanas. O látex também é usado diretamente sobre os ferimentos para estancar hemorragias ou promover a cicatrização, e ainda diluído em água para o uso em banhos de assento, usado em casos de sangramento vaginal excessivo. Segundo Ubillas et al. (1994), não foram registrados efeitos colaterais após o uso interno.

Os constituintes ativos presentes no "Sangre de Grado" incluem proantocianidinas (antioxidantes), taninos, um ligante chamado 3',4-O-dimetilcedrusina e um alcalóide chamado taspina. A atividade antiinflamatória do alcalóide taspina presente no "Sangre de Grado" foi primeiramente documentada em 1979 por Perdue et al. Em 1989, Vaisberg et al. relacionaram a atividade cicatrizante do "Sangre de Grado" ao alcalóide taspina. Posteriormente, em 1991 e 1993, outros estudos foram realizados sobre as atividades antitumoral (Itokawa et al., 1991) e

cicatrizante (Porras-Reyes et al., 1993) da taspina. O ligante, 3',4-O-dimetilcedrusina, isolado primeiramente do *C. erythrochilus* em 1990 por Pieters et al., mostrou também desempenhar uma função na atividade cicatrizante do “Sangre de Grado” (Pieters et al., 1993). Este estudo também revelou que o látex bruto estimulou o fechamento da ferida, ajudou na formação da escara sobre o sítio da ferida, regenerou a pele mais rapidamente e auxiliou na formação de colágeno, esses achados foram confirmados em 1995 (Pieters et al., 1995). O látex bruto mostrou ser quatro vezes mais efetivo na cicatrização da ferida e na formação de colágeno do que o ligante ou o alcalóide taspina (Pieters et al., 1993). Posteriormente, foram encontrados outros fitoquímicos, incluindo compostos fenólicos, proantocianidinas (como catequina e galocatequina) e diterpenos (Cai et al., 1991, 1993a e 1993b), que mostraram potente atividade antibacteriana e cicatrizante (Chen et al., 1994; Ubillas et al., 1994).

Outro constituinte ativo do látex, isolado primeiramente do *Croton lechleri* Muell. Arg., é o composto SP-303, uma proantocianidina com comprovada ação antiviral (Ubillas et al., 1994). É sabido que existem outras espécies que produzem o SP-303, estas podem ser encontradas do México ao Paraguai e sudoeste do Brasil e incluem o *C. urucurana* Baill., *C. draco* Cham & Schltdl., *C. sordidus* Benth. e *C. gossypifolius* Vahl. (Ubillas et al., 1994).

O composto SP-303, um oligômero heterogênico, apresenta em sua composição (+)-catequina, (+)-galocatequina, (-)-epicatequina e (-)-galoepicatequina, com predomínio da (+)-galocatequina e da (-)-galoepicatequina (Ubillas et al., 1994). Este composto mostrou-se eficaz contra a secreção intestinal induzida pela toxina da cólera *in vivo*, em camundongos, e a secreção de Cl⁻ mediada por AMPc *in vitro*

(Gabriel et al., 1999). O SP-303 também exibiu potente atividade antiviral e, após uma variedade de avaliações toxicológicas, demonstrou segurança, particularmente por via oral, o que era previsto, uma vez que os taninos condensados são um componente comum na dieta (Ubillas et al., 1994).

O composto SP-303 tem se mostrado bastante promissor no tratamento da diarreia. Os resultados do ensaio clínico de 2ª fase utilizando o produto SB-300 (Shaman Pharmaceuticals, Inc.), cujo principal constituinte é o composto SP-303, foram apresentados na “XII World AIDS Conference Geneva”, em junho de 1998, por Holodniy. Em seus estudos utilizando indivíduos soropositivos (HIV+), apresentando diarreia, Holodniy mostrou que o SP-303 reduziu não apenas a quantidade de fezes eliminadas como também a frequência de defecação. Além disso, o uso do SP-303 pareceu ser seguro e bem tolerado.

Recentemente, Miller et al. (2000) demonstraram que o “Sangre de Grado” facilita a cicatrização de úlcera gástrica induzida por ácido acético (80 %) em ratos e inibe a resposta secretória induzida por capsaicina em íleo de cobaio montado em câmara de Üssing.

Vale ressaltar que foi observado que existem variações na composição química entre amostras de “Sangre de Grado” obtidas de regiões diferentes (Cai et al., 1993b).

Em resumo, as espécies de *Croton* conhecidas como “Sangre de Grado” desempenham um importante papel na medicina popular de muitos países da América Latina.



FIGURA 1. “Sangre de Grado”.

10. O *CROTON URUCURANA* BAILLON

O *Croton urucurana* Baill. mede de 7 a 14 metros e seu tronco de 25 a 35 centímetros de diâmetro (Figura 2). A árvore tem folhas simples, prateadas na página inferior, de 9 a 18 centímetros de comprimento (Figura 3). É uma planta decídua, heliófita, pioneira, seletiva higrófito, característica de terrenos muito úmidos e brejosos, principalmente da floresta latifoliada semidecídua. Ocorre quase que exclusivamente em formações secundárias como capoeiras e capoeirões, onde chega a formar populações quase puras. Floresce durante um longo período do ano, iniciando-se em dezembro e prolongando-se até junho. A frutificação é quase simultânea (Figura 4), cuja maturação inicia-se em fevereiro e termina em junho. Seus nomes populares são muitos, dentre os quais encontramos sangue de grado, sangue de drago, sangra d'água, sangue-de-água, urucurana, lucurana, licurana, capixingui, tapexingui e tapixingui.

No Brasil, a árvore pode ser encontrada em estados como Bahia, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul até Rio Grande do Sul.

Existem pouquíssimos trabalhos disponíveis sobre a bio-atividade do látex extraído do *Croton urucurana* Baill. Com exceção do trabalho, publicado recentemente, onde discutimos parte dos resultados obtidos nesta dissertação (Gurgel et al., 2000), podemos encontrar também dois outros, realizados por Peres et al. (1997 e 1998), versando sobre as atividades antimicrobiana e analgésica do *C. urucurana*. No presente estudo, nós avaliamos uma possível atividade antidiarréica do látex do *Croton urucurana* em modelos animais de diarreia e secreção intestinal, e também uma possível atividade sobre a motilidade e o trânsito gastrintestinal.

Peres et al., em 1998, identificaram no *C. urucurana* a presença dos esteróides campesterol, stigmasterol e β -sitosterol. Compostos que apresentam atividade analgésica (Santos et al., 1995). Também foi identificada a presença de ácido acetil-aleurítico e sonderianina. Dois compostos fenólicos foram ainda isolados, catequina e galocatequina. Todos esses compostos, com exceção da sonderianina, apresentaram alguma atividade analgésica no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos (Peres et al., 1998). A sonderianina é um dos compostos isolados do gênero *Croton* e apresenta atividade contra *Mycobacteriu smegmatis* e *Staphylococcus aureus* (Craveiro et al., 1981; Craveiro & Silveira, 1982).



FIGURA 2. *Croton urucurana* Baill.



FIGURA 3. Folhas do *Croton urucurana* Baill.



FIGURA 4. Flores e frutos do *Croton urucurana* Baill.

11. OBJETIVOS

Gerais e específicos

Em virtude de (i) o *Croton urucurana* ter sido muito pouco estudado até o presente momento, (ii) do amplo uso, na medicina popular, do látex proveniente de várias espécies de *Croton*, incluindo o *Croton urucurana*, no tratamento de diarreia e no combate a infecções, além de outras patologias como câncer, reumatismo, feridas e úlceras (Hartwell, 1969; Bettolo & Scarpatti, 1979; Itokawa et al., 1991; Ubillas et al., 1994) e (iii) da ausência de estudos que comprovem a atividade antidiarréica do *Croton urucurana*, o presente trabalho tem por objetivo geral avaliar uma possível atividade antidiarréica do *Croton urucurana* Baill., bem como esclarecer os possíveis mecanismos de ação envolvidos nesta atividade de modo a explicar e justificar o uso popular desta planta no tratamento da diarreia.

Como objetivos específicos temos:

- Estabelecer a toxicidade aguda do látex do *Croton urucurana* em camundongos.
- Avaliar a atividade antidiarréica do látex do *Croton urucurana*, em modelos de diarreia induzida por óleo de rícino em animais, investigando uma possível participação de mecanismo opióide ou nitriérgico.
- Investigar os efeitos do látex do *Croton urucurana* no trânsito gastrointestinal de camundongos, avaliando uma possível participação de mecanismo opióide, nitriérgico, α_2 -adrenérgico ou colinérgico.

- Investigar os efeitos do látex do *Croton urucurana* na atividade secretória intestinal induzida pela toxina da cólera em camundongos.
- Estudar os efeitos do látex do *Croton urucurana* nas contrações induzidas por Cloreto de Bário, Acetilcolina e 5-HT em jejuno isolado de rato *in vitro*.

Materiais e Métodos

MATERIAIS E MÉTODOS

1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Para a realização dos experimentos foram utilizados um total de 320 camundongos albinos (*Mus musculus*) variedade Swiss-webster, adultos, de ambos os sexos, pesando entre 25-30g, e 102 ratos albinos (*Rattus norvegicus*) variedade Wistar, adultos, machos, pesando entre 150-180g, provenientes do Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia e do Biotério Central desta Universidade. Os animais foram mantidos à temperatura ambiente, com ciclos claro/escuro de 12 em 12 horas, recebendo ração padrão (Purina Chow) e água *ad libitum*.

2. COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO

O látex do *Croton urucurana* Baillon (LCU) foi coletado na Fazenda Anael, no município de São Pedro da Cipa, Mato Grosso, Brasil. A identificação da planta foi feita pela Prof. Dra. Aline de Souza Oliveira (Departamento de Botânica/Museu Nacional do Rio de Janeiro) e pelo Prof. Dr. Germano Guarim Neto (Departamento de Botânica e Ecologia/Universidade Federal do Mato Grosso). Uma amostra da planta (excicata nº 21881) foi depositada no Herbário Central da Universidade Federal do Mato Grosso. Para o tratamento dos animais o LCU foi diluído em água destilada e a dose empregada nos modelos experimentais foi expressa em termos do peso seco do mesmo.

3. SOLUÇÕES FISIOLÓGICAS

Os sais empregados no preparo das soluções fisiológicas possuíam pureza analítica (Merck e Reagen), sendo suas concentrações expressas em milimolar (mM).

- Solução Salina

NaCl 154

- Solução de Tyrode

NaCl 136; KCl 2,68; CaCl_2 1,8; MgCl_2 0,92; NaH_2PO_4 0,36; NaHCO_3 11,9; Glicose 5,5.

- Solução de Tris

6 g de Tris-HCl (trizma base, Sigma, Brasil) foram diluídos em 1000 mL de água bidestilada, obtendo-se uma concentração de 50 mM. O pH foi ajustado com solução HCl 0,1 N (Merck) para pH 7,4.

4. REAGENTES E DROGAS

Produtos	Origem
Acetilcolina	Merck, Alemanha
Sulfato de atropina	Sigma, Brasil
Carvão ativado	Sigma, Brasil
Clonidina	Sigma, Brasil
Cloreto de Bário	Reagen, Brasil

Cloridrato de Naloxona	Sigma, Brasil
Cloridrato de Loperamida (Imosec®)	Janssen-Cilag, Brasil
Clorpromazina	Sigma, Brasil
Éter Etílico	Synth, Brasil
Fisostigmina	Sigma, Brasil
Goma Arábica	Sigma, Brasil
Ioimbina	Sigma, Brasil
L-arginina	Sigma, Brasil
Óleo de Rícino	Sigma, Brasil
Serotonina (5-hidroxitriptamina)	Sigma, Brasil
Sulfato de Morfina (Dimorf®)	Cristalina, Brasil
<u>Toxina da Cólera (lote 96H4082, 300.000 unidades/mg de proteína)</u>	<u>Sigma, Brasil</u>

5. ANÁLISE FITOQUÍMICA

A análise fitoquímica por via úmida do LCU foi realizada de acordo com a marcha analítica prospectiva descrita por Matos (1988).

6. TOXICIDADE AGUDA

O estudo da toxicidade aguda do LCU foi realizado em camundongos os quais foram colocados em jejum de 12 horas e divididos em seis grupos de dez animais, sendo cada um dos grupos composto por cinco machos e cinco fêmeas, a estes grupos foram administradas doses crescentes do LCU (3, 4, 5, 6, 7 e 8 g/kg, v.o.). Os animais foram observados quanto a alterações comportamentais (movimentação

espontânea, sonolência), presença de analgesia (evidenciada através de pinçamento da cauda), alterações nos padrões fisiológicos de evacuação e micção, e quanto ao número de mortes ocorridas no período de vinte e quatro horas. A Dose Letal para 50 % dos animais (DL_{50}) foi calculada utilizando-se o método do probito (Miller & Tainter, 1944).

7. ATIVIDADE DO LÁTEX DO *Croton urucurana* BAILL. EM MODELOS DE DIARRÉIA INDUZIDA POR ÓLEO DE RÍCINO

7.1. DIARRÉIA INDUZIDA POR ÓLEO DE RÍCINO EM RATOS

Utilizamos o modelo de diarreia induzida por óleo de rícino em ratos, como descrito por Mascolo et al. (1994). Ratos machos, divididos em grupos de 10 animais cada e em jejum de sólidos por 15 horas antes do início do experimento, foram tratados com veículo (controle óleo de rícino, água destilada, 10 mL/kg, v.o.), LCU (400, 600 e 800 mg/kg, v.o.), naloxona (2 mg/kg, s.c.) ou L-arginina (600 mg/kg, i.p.). Em dois outros grupos os animais foram pré-tratados com naloxona (2 mg/kg, s.c.) ou L-arginina (600 mg/kg, i.p.) 30 minutos antes da administração do LCU (800 mg/kg, v.o.) para verificarmos uma possível participação de mecanismo opióide ou nitriérgico na atividade antidiarréica do LCU. A diarreia foi induzida pela administração de óleo de rícino (2 mL/animal, v.o.) 60 minutos após o tratamento oral ou 30 minutos após o tratamento intraperitoneal ou subcutâneo. Após a indução da diarreia os animais foram colocados em caixas individuais. O grupo controle normal foi tratado com veículo (água destilada, 10 mL/kg, v.o.) e recebeu, 60 minutos após o tratamento, azeite de oliva (2 mL/animal, v.o.). A cada hora após a

administração do óleo de rícino ou azeite de oliva, durante um período de quatro horas, os animais foram examinados por um observador alheio ao tratamento dos grupos que registrou o percentual de animais que apresentou diarreia. A diarreia foi aqui caracterizada como a presença de fezes de aspecto fluido na porção proximal da cauda do animal. A cada observação procedeu-se a limpeza desta área, assim como da região anal, para evitar possível interferência no resultado do período de observação subsequente.

7.2. DIARRÉIA INDUZIDA POR ÓLEO DE RÍCINO EM CAMUNDONGOS

Também utilizamos o modelo de diarreia induzida por óleo de rícino em camundongos, como proposto por Izzo et al. (1992). Para a realização deste experimento utilizamos camundongos machos, mantidos em jejum de sólidos por 15 horas antes do início do mesmo. A diarreia foi induzida pela administração oral de óleo de rícino (0,2 mL/animal). Os animais foram divididos em seis grupos de seis animais cada e tratados oralmente com veículo (controle óleo de rícino, água destilada, 10 mL/kg), loperamida (20 mg/kg) ou LCU (400, 600 e 800 mg/kg) 60 minutos antes da indução da diarreia. O grupo controle normal foi tratado com veículo (10 mL/kg, v.o.), 60 minutos antes da administração oral de azeite de oliva (0,2 mL/animal). Os animais foram então colocados em caixas individuais e duas horas após a administração do óleo de rícino ou do azeite de oliva foi atribuído a cada animal um escore de 0-3 onde: 0 = ausência de diarreia; 1 = eliminação de fezes de aspecto úmido; 2 = eliminação de fezes de aspecto pastoso em pequena/moderada quantidade e 3 = eliminação de fezes de aspecto fluido ou pastoso em grande quantidade. Além dos escores, foi registrada a quantidade de

fezes, em miligramas, eliminada por cada animal, assim como a perda de peso corpóreo apresentada pelos mesmos. A quantidade de fezes eliminada foi registrada em termos da quantidade de fezes (g) eliminada por quilo de peso corpóreo do animal.

8. ATIVIDADE DO LÁTEX DO *Croton urucurana* BAILL. SOBRE O TRÂNSITO GASTRINTESTINAL

8.1. TRÂNSITO GASTRINTESTINAL EM CAMUNDONGOS

O efeito do LCU sobre o trânsito gastrintestinal foi avaliado pelo método descrito por Meli et al. (1990). Foram utilizados camundongos machos, mantidos em jejum de sólidos por 15 horas antes do início do experimento e divididos em grupos de 8 animais cada. Este modelo foi realizado em três etapas para que pudéssemos avaliar um possível envolvimento do sistema opióide (1ª Etapa), do óxido nítrico (2ª Etapa) ou dos receptores α_2 -adrenérgicos (3ª Etapa) no efeito do LCU sobre o trânsito gastrintestinal.

Na primeira etapa do experimento os animais foram tratados com veículo (água destilada, 10 mL/kg, v.o.), morfina (10 mg/kg, s.c.) ou LCU (400, 600 e 800 mg/kg, v.o.). Para avaliarmos um possível envolvimento do sistema opióide no efeito do LCU sobre o trânsito gastrintestinal dois grupos foram pré-tratados com naloxona (2 mg/Kg, s.c.) 30 minutos antes do tratamento com morfina (10 mg/kg, s.c.) ou LCU (600 mg/kg, v.o.), um terceiro grupo foi tratado apenas com naloxona na mesma dose. Uma hora após o tratamento oral ou 30 minutos após o tratamento subcutâneo, os animais receberam por via oral uma preparação contendo 10 % de

carvão ativado e 5 % de goma arábica (0,2 mL/animal). Vinte minutos após a administração deste marcador (carvão ativado), os animais dos respectivos grupos foram sacrificados por deslocamento cervical. Procedeu-se então a retirada do estômago e intestino delgado de cada animal que foram estendidos em uma superfície limpa. A distância percorrida pelo marcador em relação ao comprimento total do intestino delgado foi medida e expressa como percentagem.

Na segunda etapa do experimento, para verificarmos um possível envolvimento do óxido nítrico na atividade do LCU sobre o trânsito gastrintestinal, os animais foram tratados com veículo (água destilada, 10 mL/kg, v.o.), LCU (600 mg/kg, v.o.), L-arginina (600 mg/kg, i.p.) ou L-arginina (600 mg/kg, i.p.) 30 minutos antes da administração do LCU (600 mg/kg, v.o.). Uma hora após o tratamento oral ou 30 minutos após o tratamento intraperitoneal, os animais receberam por via oral uma preparação contendo 10 % de carvão ativado e 5 % de goma arábica (0,2 mL/animal). Vinte minutos após esta administração, os animais foram sacrificados e a distância percorrida pelo marcador (carvão) em relação ao comprimento total do intestino delgado foi determinada como descrito anteriormente.

Na terceira etapa do experimento, para avaliarmos um possível envolvimento dos receptores α_2 -adrenérgicos na inibição do trânsito gastrintestinal induzida pelo LCU, os animais foram tratados com veículo (água destilada, 10 mL/kg, v.o.), clonidina (0,1 mg/kg, v.o.), LCU (600 mg/kg, v.o.) ou ioimbina (1 mg/kg, i.p.). Outros dois grupos foram tratados com o antagonista seletivo dos receptores α_2 -adrenérgicos, ioimbina (1 mg/kg, i.p.), 10 minutos antes da administração de clonidina (0,1 mg/kg, v.o.) ou LCU (600 mg/kg, v.o.). Uma hora após o tratamento oral ou 30 minutos após o tratamento intraperitoneal, os animais receberam por via

oral uma preparação contendo 10 % de carvão ativado e 5 % de goma arábica (0,2 mL/animal). Vinte minutos após esta administração, os animais foram sacrificados e a distância percorrida pelo marcador (carvão) em relação ao comprimento total do intestino delgado foi determinada como descrito anteriormente.

8.2. TRÂNSITO GASTRINTESTINAL ESTIMULADO POR FISOSTIGMINA EM CAMUNDONGOS

Para avaliarmos uma possível atividade anticolinérgica do LCU na inibição do trânsito gastrintestinal, utilizamos o modelo de trânsito gastrintestinal estimulado por fisostigmina, um inibidor da colinesterase. Camundongos machos, mantidos em jejum de sólidos por 15 horas antes do início do experimento, foram divididos em grupos de 8 animais cada e tratados oralmente com veículo (controle fisostigmina, água destilada, 10 mL/kg), atropina (5 mg/kg), LCU (600 mg/kg), ou atropina (5 mg/kg) em associação ao LCU (600 mg/kg). Imediatamente após o tratamento, os animais receberam uma injeção intraperitoneal de fisostigmina (0,25 mg/kg). O grupo controle normal foi tratado com veículo (água destilada, 10 mL/kg, v.o.) e imediatamente após este tratamento recebeu, por via intraperitoneal, água destilada em volume igual ao da fisostigmina administrada aos demais grupos. Após 60 minutos do tratamento, os animais receberam por via oral uma preparação contendo 10 % de carvão ativado e 5 % de goma arábica (0,2 mL/animal). Vinte minutos após esta administração os animais foram sacrificados e a distância percorrida pelo marcador (carvão) em relação ao comprimento total do intestino delgado foi medida e expressa como percentagem, como descrito anteriormente.

9. ATIVIDADE DO LÁTEX DO *Croton urucurana* BAILL. SOBRE A SECREÇÃO INTESTINAL

9.1. SECREÇÃO INTESTINAL INDUZIDA POR TOXINA DA CÓLERA EM CAMUNDONGOS

O efeito do LCU sobre a secreção de fluido intestinal foi estudado através do método descrito por Richardson & Kuhn (1986), com pequenas modificações. Este método avalia a acumulação de fluido no intestino de camundongos após a administração oral de toxina da cólera (37,5 µg/mL). Camundongos machos divididos em grupos de 8 animais cada e submetidos a jejum sólido de 15 horas antes do início do experimento, foram tratados oralmente com veículo (controle toxina, água destilada, 10 mL/kg), clorpromazina (25 mg/kg) ou LCU (600 mg/kg), 60 minutos antes da administração da toxina da cólera (15 µg/animal em 0,4 mL de Tris, v.o.). A toxina da cólera foi diluída em 50 mmol/L de tampão Tris (pH 7,4). Outros dois grupos foram tratados oralmente com água destilada (controle veículo, 10 mL/kg) ou LCU (controle LCU, 600 mg/kg), 60 minutos antes da administração de 0,4 mL de 50 mmol/L de tampão Tris (pH 7,4) por via oral. Após 6 horas da administração da toxina da cólera ou tampão Tris sozinho, os animais foram sacrificados por excesso de éter e tiveram parte de seu intestino, do piloro ao ceco, cuidadosamente removido de modo a evitar ruptura do tecido ou perda de líquido. O mesentério foi removido e o peso do tecido e do fluido em seu interior foi determinado em miligramas. O intestino foi então aberto longitudinalmente, o fluido removido, e o tecido gentilmente seco em papel de filtro. O peso do tecido seco foi determinado em miligramas. A secreção intestinal foi tomada, em miligramas, como

sendo a diferença entre os pesos do intestino tomados antes e após a eliminação do fluido intestinal.

10. ATIVIDADE DO LÁTEX DO *Croton urucurana* BAILL. SOBRE A MOTILIDADE INTESTINAL

10.1. CONTRAÇÕES INDUZIDAS POR AGONISTAS EM JEJUNO ISOLADO DE RATO *IN VITRO*

Ratos machos, pesando 160-180g, foram mantidos em jejum de sólidos por 24 horas e utilizados no presente estudo. Após sacrifício por deslocamento cervical, o animal foi colocado em posição de decúbito dorsal e foi então feita uma incisão em seu abdômen. Uma porção da parte proximal de seu jejuno foi retirada (± 2 cm), lavada com a solução nutritiva de Tyrode e imediatamente montada em um banho para órgão isolado, contendo 10 mL da solução de Tyrode aerada continuamente e mantida à temperatura de 37 °C por meio de banho-maria. Após estabilização da preparação por um período de 30 minutos, foi iniciado o registro das respostas contráteis para Acetilcolina ($5,5 \times 10^{-6}$ M), Cloreto de Bário (1×10^{-3} M) e 5-HT ($0,47 \times 10^{-6}$ M), em intervalos de 5 minutos, antes e após a incubação por 3 minutos em doses crescentes do LCU (30, 100 e 300 $\mu\text{g/mL}$). As contrações foram registradas em quimógrafo através de alavanca isotônica de inscrição frontal com uma tensão de 0,5 g.

11. MÉTODOS ESTATÍSTICOS

Os resultados obtidos nos experimentos foram expressos como média \pm E.P.M. (erro padrão da média), com exceção do modelo de diarreia induzida por óleo de rícino em ratos, onde os resultados foram expressos como o percentual de animais que apresentou diarreia, e do modelo de diarreia induzida por óleo de rícino em camundongos, onde a fluidez das fezes foi avaliada através de escores e os resultados expressos em termos da frequência dos escores obtidos em cada grupo.

No modelo de diarreia induzida por óleo de rícino em ratos utilizamos o teste de Qui-quadrado e no estudo da fluidez das fezes utilizando o modelo de diarreia induzida por óleo de rícino em camundongos, assim como no modelo de jejuno isolado de rato utilizamos o teste Kruskal-Wallis, ambos precedidos da análise de variância (ANOVA). Para o cálculo dos níveis de significância dos demais experimentos foi utilizada a análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Student-Newman-Keul. Valores de p menores que 0,05 foram considerados significantes.

Resultados

RESULTADOS

1. ANÁLISE FITOQUÍMICA

A análise fitoquímica do LCU revelou a presença de saponinas, esteróides, alcalóides, taninos pirogálicos, taninos catéquicos, catequinas, flavonóis e flavonas, antocianinas e antocianidinas (Tabela 1).

2. TOXICIDADE AGUDA

A Tabela 2 mostra o número de mortes apresentado por cada grupo tratado no período de 24 horas após a administração do LCU nas doses crescentes de 3, 4, 5, 6, 7 e 8 g/kg, v.o.

A Dose Letal do LCU para 50 % dos animais (DL_{50}), administrada por via oral, é de $5,20 \pm 0,13$ g/Kg.

Todas as doses do LCU utilizadas neste modelo produziram analgesia, evidenciada pela ausência de reação do animal ao teste de compressão da cauda realizado com pinça. O LCU, nas doses de 6, 7 e 8 g/Kg, produziu em alguns animais taquipnéia, sedação e cianose de extremidades com parada cardíaco-respiratória.

TABELA 1. Resultado da análise fitoquímica do látex do *Croton urucurana* (LCU).

Classes químicas	*Presença da substância no LCU
Saponinas	+++
Esteróides	+++
Alcalóides	+++
Taninos Pirogálicos	+
Taninos Catéquicos	+
Catequinas	+
Flavonóis	+
Flavononas	+
Antocianinas	+
Antocianidinas	+

* Corresponde a intensidade da coloração (+, ++ ou +++) obtida com a reação para determinar a presença ou não da substância no material estudado, como descrito por Matos, em 1988.

TABELA 2. Percentual de mortes, no período de 24 horas, após o tratamento oral com o látex do *Croton urucurana* (LCU).

LCU (g/kg, v.o.)	Nº de animais	Nº de mortes	% de mortes
3	10	0	0
4	10	2	20
5	10	6	60
6	10	6	60
7	10	8	80
8	10	10	100

A Tabela mostra o número de mortes e o percentual de mortes ocorrido em um período de 24 horas após o tratamento de camundongos de ambos os sexos (5 machos e 5 fêmeas por grupo) com o LCU nas doses de 3, 4, 5, 6, 7 e 8 g/kg, v.o.

3. ATIVIDADE DO LÁTEX DO *Croton urucurana* BAILL. EM MODELOS DE DIARRÉIA INDUZIDA POR ÓLEO DE RÍCINO

3.1. DIARRÉIA INDUZIDA POR ÓLEO DE RÍCINO EM RATOS

A Tabela 3 mostra que todos os animais do grupo controle óleo de rícino apresentaram diarreia nas duas primeiras horas após a administração do óleo, e apenas 40 e 10 % deles apresentaram diarreia na terceira e quarta horas de observação, respectivamente. A incidência de diarreia ocorrida nos dois primeiros intervalos de observação, isoladamente, e no período de quatro horas após a administração do óleo de rícino foi considerada significativa ($p < 0,001$) quando comparada ao grupo controle normal, ao qual foi administrado azeite de oliva e não óleo de rícino, neste grupo não foi registrada presença de diarreia em nenhum dos intervalos de observação (Tabela 3).

O pré-tratamento dos ratos com o LCU nas doses de 600 e 800 mg/kg retardou o aparecimento da diarreia com uma significativa inibição durante as duas primeiras horas ($p < 0,01$) (Tabela 3).

O antagonista dos receptores opióides, naloxona (2 mg/kg), não foi capaz de alterar o efeito antidiarréico produzido pelo LCU (800 mg/kg) nas duas primeiras horas de observação, enquanto que a L-arginina (600 mg/kg), substrato para a produção de óxido nítrico, reverteu parcialmente o efeito do LCU (800 mg/kg) apenas na segunda hora de observação (Tabela 4).

A naloxona (2 mg/kg) e a L-arginina (600 mg/kg), quando administradas sozinhas, não causaram alteração significativa na diarreia induzida por óleo de rícino.

TABELA 3. Efeito do látex do *Croton urucurana* (LCU) no modelo de diarreia induzida por óleo de rícino em ratos.

Tratamento (mg/kg)	Animais com diarreia (%)				
	1 h	2 h	3 h	4 h	1-4 h
Controle Normal	0	0	0	0	0
(veículo, 10 mL/kg, v.o.)	(0/10)	(0/10)	(0/10)	(0/10)	(0/10)
Controle Óleo de Rícino	100 ^a	100 ^a	40	10	100 ^a
(veículo, 10 mL/kg, v.o.)	(10/10)	(10/10)	(4/10)	(1/10)	(10/10)
LCU 400, v.o.	60	70	30	60	100
	(6/10)	(7/10)	(3/10)	(6/10)	(10/10)
LCU 600, v.o.	0 ^{bbb}	20 ^{bb}	30	10	60
	(0/10)	(2/10)	(3/10)	(1/10)	(6/10)
LCU 800, v.o.	0 ^{bbb}	10 ^{bbb}	40	40	50 ^b
	(0/10)	(1/10)	(4/10)	(4/10)	(5/10)

Os valores representam o percentual de animais que apresentou diarreia nos quatro períodos de observação e no intervalo de quatro horas após a administração do óleo de rícino ou azeite de oliva (n=10). O grupo Controle Normal recebeu azeite de oliva (2 mL/animal, v.o.) 60 minutos após o tratamento, os demais grupos receberam o mesmo volume de óleo de rícino. ^a $p < 0,001$ comparado ao grupo Controle Normal; ^b $p < 0,05$; ^{bb} $p < 0,01$ e ^{bbb} $p < 0,001$ comparado ao grupo Controle Óleo de Rícino (ANOVA e teste do Qui-quadrado).

TABELA 4. Efeito da naloxona e L-arginina sobre a ação do látex do *Croton urucurana* (LCU) no modelo de diarreia induzida por óleo de rícino em ratos.

Tratamento (mg/kg)	Animais com diarreia (%)				
	1 h	2 h	3 h	4 h	1-4 h
Controle Óleo de Rícino	100	100	40	10	100
(veículo, 10 mL/kg, v.o.)	(10/10)	(10/10)	(4/10)	(1/10)	(10/10)
LCU 800, v.o.	0 ^{aa}	10 ^{aa}	40	40	50 ^a
	(0/10)	(1/10)	(4/10)	(4/10)	(5/10)
L-arginina 600, i.p.	100	100	50	10	100
	(10/10)	(10/10)	(5/10)	(1/10)	(10/10)
L-arginina 600, i.p. + LCU 800, v.o.	0 ^{aa}	50 ^{ab}	40	20	70
	(0/10)	(5/10)	(4/10)	(2/10)	(7/10)
Naloxona 2, s.c.	100	100	30	40	100
	(10/10)	(10/10)	(3/10)	(4/10)	(10/10)
Naloxona 2, s.c. + LCU 800, v.o.	0 ^{aa}	0 ^{aa}	40	40	60
	(0/10)	(0/10)	(4/10)	(4/10)	(6/10)

Os valores representam o percentual de animais que apresentou diarreia nos quatro períodos de observação e no intervalo de quatro horas após a administração do óleo de rícino (n=10). ^ap<0,05 e ^{aa}p<0,001 comparado ao grupo Controle Óleo de Rícino e ^bp<0,01 comparado ao grupo tratado com LCU (800 mg/kg, v.o.) (ANOVA e teste do Qui-quadrado).

3.2. DIARRÉIA INDUZIDA POR ÓLEO DE RÍCINO EM CAMUNDONGOS

As Figuras 5, 6 e 7 mostram que a administração de óleo de rícino aos camundongos não apenas aumentou a quantidade de fezes eliminada pelos animais fazendo com que estes apresentassem significativa perda de peso, como também levou a uma diminuição na consistência das fezes, ou seja, estas tornaram-se mais umedecidas, o que mostra o aumento da secreção intestinal provocado pelo óleo de rícino. Podemos então afirmar que o grupo controle óleo de rícino apresentou diarreia nas duas primeiras horas após a administração do óleo e esta foi significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle normal, ao qual foi administrado azeite de oliva e não óleo de rícino, neste grupo não foi registrada a presença de diarreia.

A Figura 5 mostra que o LCU nas doses de 600 e 800 mg/kg, assim como a loperamida (20 mg/kg, v.o.) produziram significativa ($p < 0,05$) redução na fluidez das fezes quando estes grupos foram comparados com o grupo Controle Óleo de Rícino.

O pré-tratamento dos animais com o LCU nas doses de 400, 600 e 800 mg/kg, assim como com a loperamida na dose de 20 mg/kg, também foi capaz de reduzir, de forma significativa ($p < 0,05$), a quantidade de fezes eliminada neste intervalo de um valor controle (Controle Óleo de Rícino) de $11,13 \pm 3,57$ g/kg de peso corpóreo para $5,09 \pm 1,70$; $2,16 \pm 1,14$; $1,82 \pm 1,09$ e $1,62 \pm 1,04$ g/kg de peso corpóreo, respectivamente (Tabela 5, Figura 6).

Além de reduzir a fluidez das fezes e a quantidade de fezes eliminadas pelos animais, o pré-tratamento com o LCU nas doses de 400, 600 e 800 mg/kg, assim como com a loperamida na dose de 20 mg/kg, também foi capaz de reduzir de forma

significativa ($p < 0,05$), a perda de peso apresentada pelos animais de um valor controle (Controle Óleo de Rícino) de $1,60 \pm 0,29$ g para $0,50 \pm 0,18$; $0,60 \pm 0,18$; $0,66 \pm 0,16$ e $0,20 \pm 0,20$ g respectivamente (Tabela 6, Figura 7).

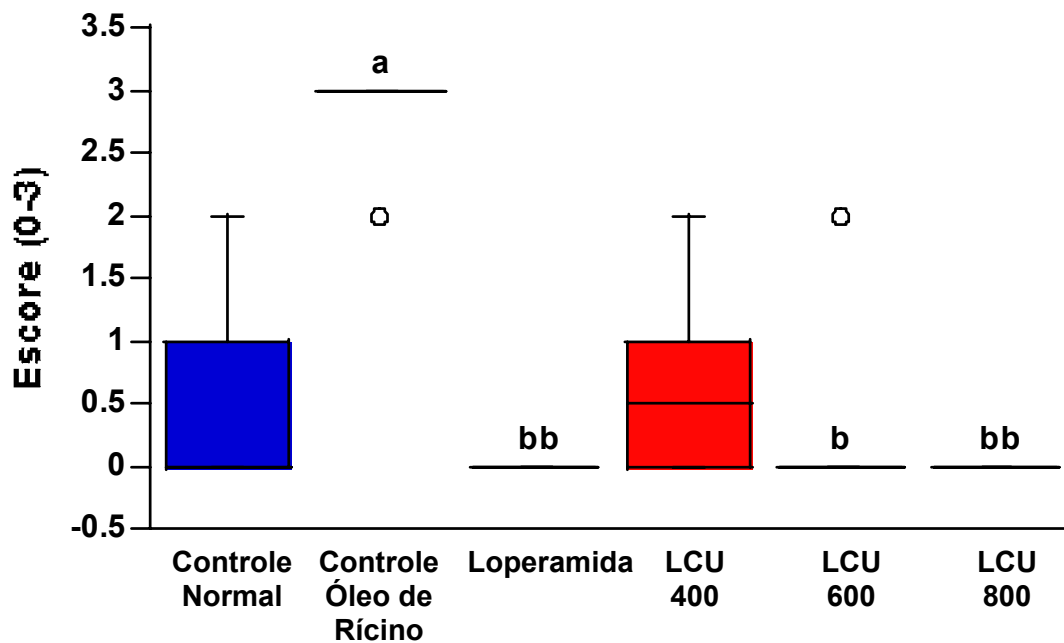


FIGURA 5. Efeito do látex do *Croton urucurana* (LCU) sobre a fluidez das fezes no modelo de diarreia induzida por óleo de rícino em camundongos. Os animais (camundongos, machos, n=6) foram tratados oralmente com veículo (Controle Normal, 10 mL/kg), veículo (Controle Óleo de Rícino, 10 mL/kg), loperamida (20 mg/kg) ou LCU (400, 600 e 800 mg/kg) e 60 min após o tratamento receberam 0,2 mL de óleo de rícino por via oral. O grupo Controle Normal recebeu o mesmo volume de azeite de oliva. As caixas representam a distribuição dos escores em cada grupo, 2 h após a administração do óleo de rícino ou azeite de oliva. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo Controle Normal; ^b $p < 0,05$ e ^{bb} $p < 0,01$ comparado ao grupo Controle Óleo de Rícino (ANOVA e Teste Kruskal-Wallis).

TABELA 5. Efeito do látex do *Croton urucurana* (LCU) sobre a quantidade de fezes eliminadas no modelo de diarreia induzida por óleo de rícino em camundongos.

Tratamento (mg/kg)	Peso das fezes (g)/kg de peso corpóreo
Controle Normal (veículo, 10 mL/kg, v.o.)	2,85 ± 0,64
Controle Óleo de Rícino (veículo, 10 mL/kg, v.o.)	11,13 ± 3,57 ^a
Loperamida 20, v.o.	1,62 ± 1,04 ^{bb}
LCU 400, v.o.	5,09 ± 1,70 ^b
LCU 600, v.o.	2,16 ± 1,14 ^{bb}
LCU 800, v.o.	1,82 ± 1,09 ^{bb}

Os animais foram tratados e 60 minutos após o tratamento receberam 0,2 mL de óleo de rícino por via oral. O grupo Controle Normal recebeu o mesmo volume de azeite de oliva. Os valores representam a média ± E.P.M. da quantidade de fezes (g) eliminada por quilo de peso corpóreo dos animais, no intervalo de duas horas após a administração do óleo de rícino ou azeite de oliva (n=06). ^ap<0,01 comparado ao grupo Controle Normal; ^bp<0,05 e ^{bb}p<0,01 comparado ao grupo Controle Óleo de Rícino (ANOVA e Teste de Student-Newman-Keul).

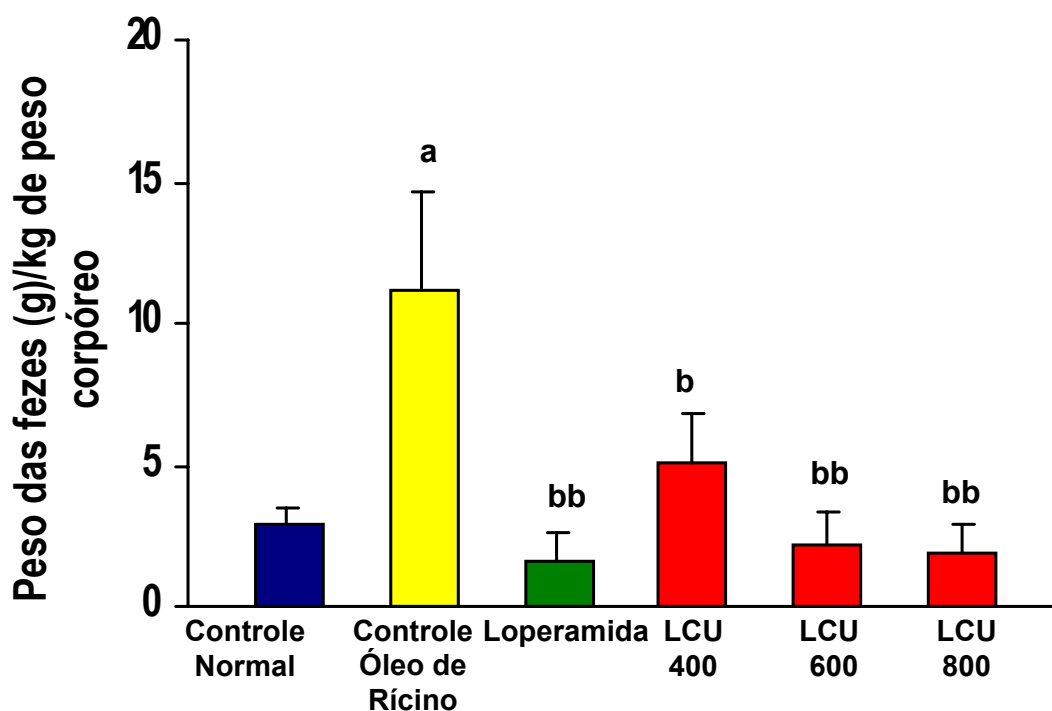


FIGURA 6. Efeito do látex do *Croton urucurana* (LCU) sobre a quantidade de fezes (g) eliminada por quilo de peso corpóreo dos animais no modelo de diarreia induzida por óleo de rícino em camundongos. Os animais (camundongos, machos, n=6) foram tratados oralmente com veículo (Controle Normal, 10 mL/kg), veículo (Controle Óleo de Rícino, 10 mL/kg), loperamida (20 mg/kg) ou LCU (400, 600 e 800 mg/kg) e 60 min após o tratamento receberam 0,2 mL de óleo de rícino por via oral. O grupo Controle Normal recebeu o mesmo volume de azeite de oliva. As colunas representam a média \pm E.P.M. da quantidade de fezes (g) eliminada por quilo de peso corpóreo do animal, no intervalo de 2 h após a administração do óleo de rícino ou azeite de oliva. ^a $p < 0,01$ comparado ao grupo Controle Normal; ^b $p < 0,05$ e ^{bb} $p < 0,01$ comparado ao grupo Controle Óleo de Rícino (ANOVA e Teste de Student-Newman-Keul).

TABELA 6. Efeito do látex do *Croton urucurana* (LCU) sobre a perda de peso corpóreo apresentada pelos animais no modelo de diarreia induzida por óleo de rícino em camundongos.

Tratamento (mg/kg)	Peso corpóreo perdido (g)
Controle Normal (veículo, 10 mL/kg, v.o.)	0,91 ± 0,15
Controle Óleo de Rícino (veículo, 10 mL/kg, v.o.)	1,60 ± 0,29 ^a
Loperamida 20, v.o.	0,20 ± 0,20 ^{bbb}
LCU 400, v.o.	0,50 ± 0,18 ^{bb}
LCU 600, v.o.	0,60 ± 0,18 ^b
LCU 800, v.o.	0,66 ± 0,16 ^b

Os animais foram tratados e 60 minutos após o tratamento receberam 0,2 mL de óleo de rícino por via oral. O grupo Controle Normal recebeu o mesmo volume de azeite de oliva. Os valores representam a média ± E.P.M. da perda de peso apresentada por cada grupo, expressa em gramas, no intervalo de duas horas após a administração do óleo de rícino ou azeite de oliva (n=06). ^a*p*<0,05 comparado ao grupo Controle Normal; ^b*p*<0,05, ^{bb}*p*<0,01 e ^{bbb}*p*<0,001 comparado ao grupo Controle Óleo de Rícino (ANOVA e Teste de Student-Newman-Keul).

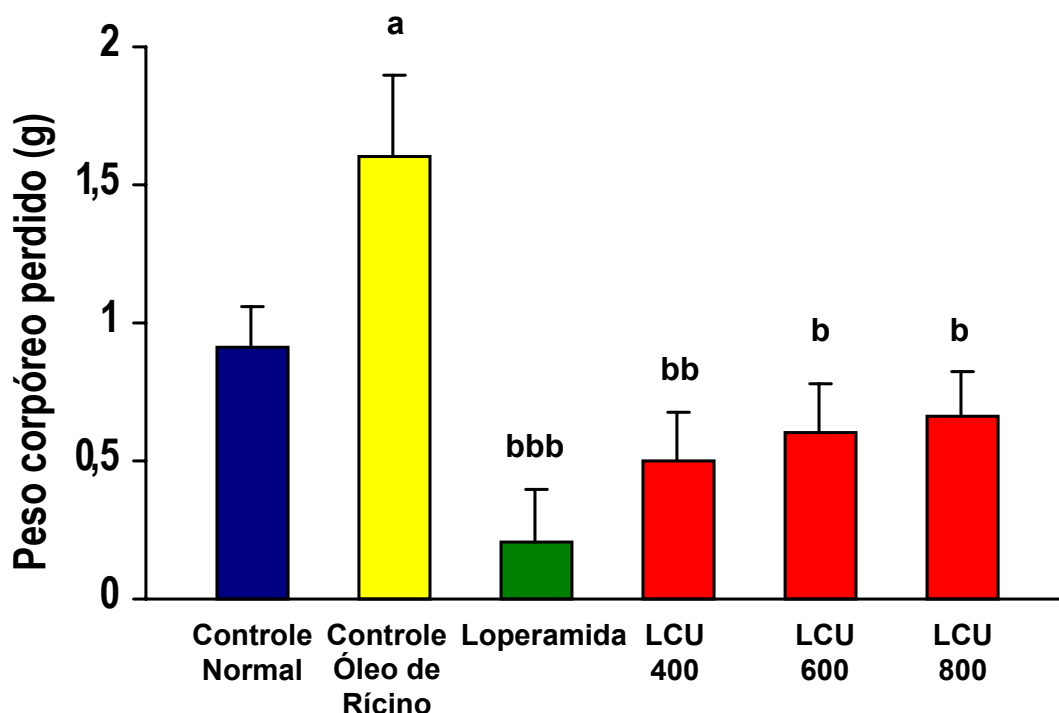


FIGURA 7. Efeito do látex do *Croton urucurana* (LCU) sobre a perda de peso corpóreo apresentada pelos animais no modelo de diarreia induzida por óleo de rícino em camundongos. Os animais (camundongos, machos, n=6) foram tratados oralmente com veículo (Controle Normal, 10 mL/kg), veículo (Controle Óleo de Rícino, 10 mL/kg), loperamida (20 mg/kg) ou LCU (400, 600 e 800 mg/kg) e 60 min após o tratamento receberam 0,2 mL de óleo de rícino por via oral. O grupo Controle Normal recebeu o mesmo volume de azeite de oliva. As colunas representam a média \pm E.P.M. da perda de peso corpóreo apresentada por cada grupo, em gramas, no intervalo de 2 h após a administração do óleo de rícino ou azeite de oliva. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo Controle Normal; ^b $p < 0,05$, ^{bb} $p < 0,01$ e ^{bbb} $p < 0,001$ comparado ao grupo Controle Óleo de Rícino (ANOVA e Teste de Student-Newman-Keul).

4. ATIVIDADE DO LÁTEX DO *Croton urucurana* BAILL. SOBRE O TRÂNSITO GASTRINTESTINAL

4.1. TRÂNSITO GASTRINTESTINAL EM CAMUNDONGOS

A Tabela 7 e a Figura 8 mostram que o LCU nas três doses utilizadas (400, 600 e 800 mg/kg, v.o.), assim como a morfina (10 mg/kg, s.c.), produziram significativa ($p<0,01$) inibição do trânsito gastrintestinal normal de um valor controle de $71,31 \pm 3,82$ % do comprimento total do intestino percorrido para $44,15 \pm 2,71$; $44,56 \pm 3,39$; $46,14 \pm 6,24$ e $13,81 \pm 3,12$ %, respectivamente. Contudo, a inibição observada com o LCU não foi dose-dependente.

A naloxona (2 mg/kg, s.c.), um antagonista opióide, antagonizou de forma significativa ($p<0,01$) o efeito inibitório da morfina sobre o trânsito gastrintestinal de um valor de $13,81 \pm 3,12$ para $41,21 \pm 2,95$ %. Contudo, a naloxona (2 mg/kg, s.c.) não foi capaz de reverter, de forma significativa, o efeito exercido pelo LCU na dose de 600 mg/kg, v.o. (Tabela 8, Figura 9).

A L-arginina (600 mg/kg, i.p.), substrato para a produção de óxido nítrico, também não foi capaz de alterar de forma significativa o efeito do LCU sobre o trânsito gastrintestinal (Tabela 9, Figura 10).

A Figura 11 mostra que o LCU (600 mg/kg, v.o.), assim como a clonidina (0,1 mg/kg, v.o.), reduziram o trânsito gastrintestinal de forma significativa ($p<0,001$), para $38,95 \pm 4,67$ e $23,98 \pm 3,12$ % respectivamente, em relação ao grupo controle ($74,90 \pm 8,54$ %).

A ioimbina (1 mg/kg, i.p.) antagonizou de forma significativa ($p<0,01$) o efeito inibitório da clonidina (0,1 mg/kg, v.o.) sobre o trânsito gastrintestinal de um valor de $23,98 \pm 3,12$ % (clonidina) para um valor de $50,75 \pm 5,85$ % (ioimbina em associação a clonidina), contudo a ioimbina não foi capaz de alterar de forma significativa o efeito inibitório do LCU (600 mg/kg, v.o.) sobre o trânsito gastrintestinal, neste grupo o valor registrado foi de $48,36 \pm 4,75$ % enquanto que no grupo tratado apenas com LCU foi de $38,95 \pm 4,67$ % (Tabela 10, Figura 11).

A naloxona (2 mg/kg, s.c.), a L-arginina (600 mg/kg, i.p.) e a ioimbina (1 mg/kg, i.p.), quando administradas sozinhas, não foram capazes de causar alteração significativa no trânsito gastrintestinal em relação ao grupo controle (Tabelas 8, 9 e 10).

TABELA 7. Efeito da administração oral do látex do *Croton urucurana* (LCU) sobre o trânsito gastrintestinal de camundongos.

Tratamento (mg/kg)	% Percorrido	% de Inibição
Controle (veículo, 10 mL/kg, v.o.)	71,31 ± 3,82	-
Morfina 10, s.c.	13,81 ± 3,12 **	80,64
LCU 400, v.o.	44,15 ± 2,71 *	38,09
LCU 600, v.o.	44,56 ± 3,39 *	37,52
LCU 800, v.o.	46,14 ± 6,24 *	35,30

Os animais foram tratados e 60 minutos após o tratamento oral ou 30 minutos após o tratamento subcutâneo, administrou-se o marcador (0,2 mL/animal, v.o.). Vinte minutos após a administração deste, os animais dos respectivos grupos foram sacrificados. Os valores representam a média ± E.P.M. da distância percorrida pelo marcador (carvão) em relação ao comprimento total do intestino delgado e o percentual de inibição do trânsito gastrintestinal, expressos como percentagem (n=08). * $p < 0,01$ e ** $p < 0,001$ comparado ao grupo Controle (ANOVA e Teste de Student-Newman-Keul).

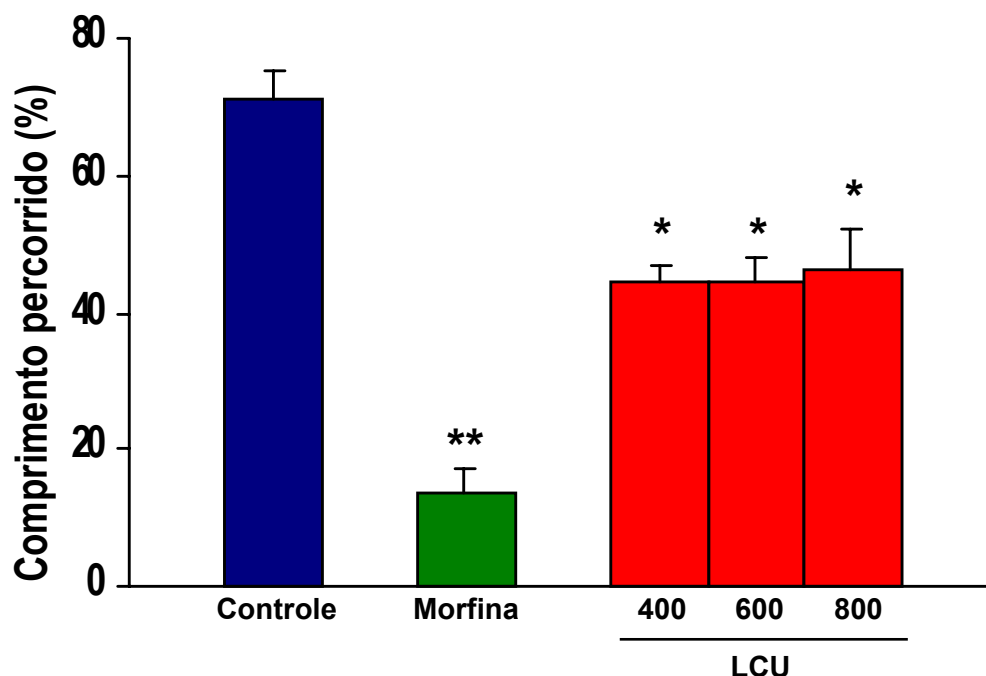


FIGURA 8. Efeito da administração oral do látex do *Croton uucurana* (LCU) sobre o trânsito gastrintestinal de camundongos. Camundongos machos (n=08) foram tratados com veículo (Controle, 10 mL/kg, v.o.), morfina (10 mg/kg, s.c.) ou LCU (400, 600 e 800 mg/kg, v.o.). Uma hora após o tratamento oral ou 30 min após o tratamento subcutâneo, administrou-se o marcador (0,2 mL/animal, v.o.) e 20 min após a administração deste os animais dos respectivos grupos foram sacrificados. As colunas representam a média \pm E.P.M. da distância percorrida pelo marcador (carvão) em relação ao comprimento total do intestino delgado, expressa como porcentagem. * $p < 0,01$ e ** $p < 0,001$ comparado ao grupo Controle (ANOVA e Teste de Student-Newman-Keul).

TABELA 8. Efeito da naloxona sobre a atividade do látex do *Croton urucurana* (LCU) no trânsito gastrintestinal de camundongos.

Tratamento (mg/kg)	% Percorrido	% de Inibição
Controle (veículo, 10 mL/kg, v.o.)	71,31 ± 3,82	-
Naloxona 2, s.c.	61,27 ± 7,43	14,07
Morfina 10, s.c.	13,81 ± 3,12 ^a	80,64
LCU 600, v.o.	44,56 ± 3,39 ^a	37,52
Naloxona 2, s.c. + Morfina 10, s.c.	41,21 ± 2,95 ^b	42,22
Naloxona 2, s.c.+ LCU 600, v.o.	54,13 ± 7,99	24,10

Os animais foram tratados e 60 minutos após o tratamento oral ou 30 minutos após o tratamento subcutâneo, administrou-se o marcador (0,2 mL/animal, v.o.). Vinte minutos após a administração deste, os animais dos respectivos grupos foram sacrificados. Os valores representam a média ± E.P.M. da distância percorrida pelo marcador (carvão) em relação ao comprimento total do intestino delgado e o percentual de inibição do trânsito gastrintestinal, expressos como percentagem (n=08). ^a*p*<0,001 comparado ao grupo Controle e ^b*p*<0,01 comparado ao grupo tratado com morfina (ANOVA e Teste de Student-Newman-Keul).

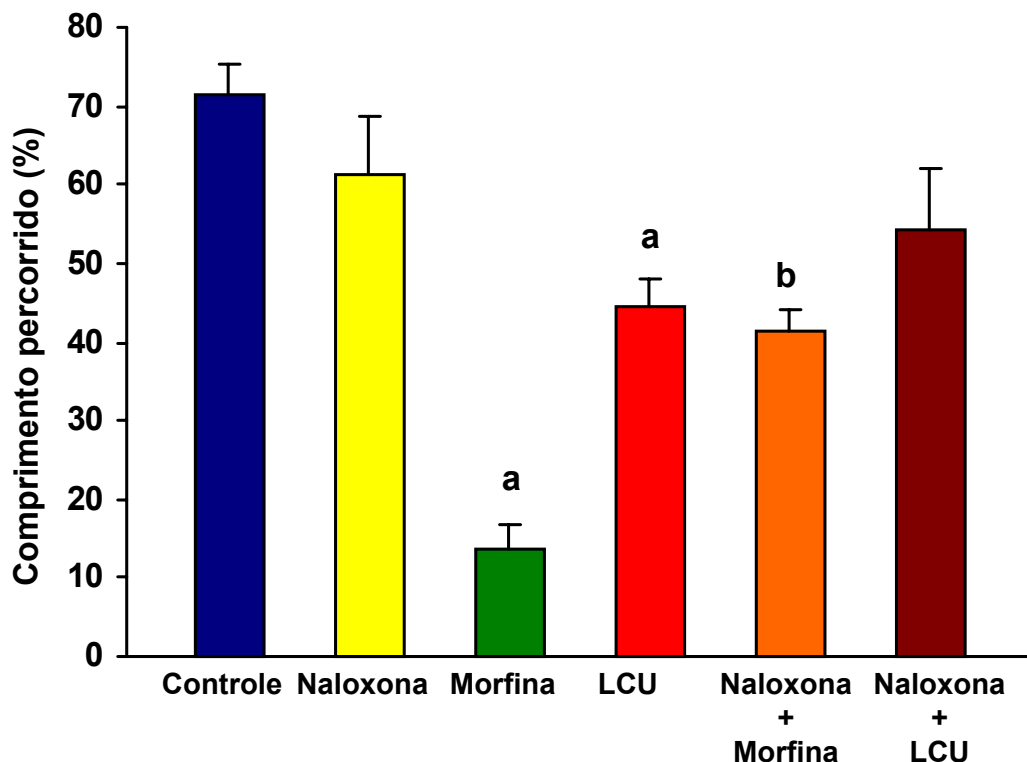


FIGURA 9. Efeito da naloxona sobre a atividade do látex do *Croton urucurana* (LCU) no trânsito gastrointestinal de camundongos.

Camundongos machos (n=08) foram tratados com veículo (Controle, 10 mL/kg, v.o.), naloxona (2 mg/kg, s.c.), morfina (10 mg/kg, s.c.) ou LCU (600 mg/kg, v.o.). Outros dois grupos foram tratados com naloxona (2 mg/kg, s.c.) 30 min antes da administração de morfina ou LCU, nas mesmas doses. Uma hora após o tratamento oral ou 30 min após o tratamento subcutâneo, administrou-se o marcador (0,2 mL/animal, v.o.) e 20 min após a administração deste, os animais dos respectivos grupos foram sacrificados. As colunas representam a média \pm E.P.M. da distância percorrida pelo marcador (carvão) em relação ao comprimento total do intestino delgado, expressa como percentagem. ^a $p < 0,001$ comparado ao grupo Controle e ^b $p < 0,01$ comparado ao grupo tratado com morfina (ANOVA e Teste de Student-Newman-Keul).

TABELA 9. Efeito da L-arginina sobre a atividade do látex do *Croton urucurana* (LCU) no trânsito gastrintestinal de camundongos.

Tratamento (mg/kg)	% Percorrido	% de Inibição
Controle (veículo, 10 mL/kg, v.o.)	68,50 ± 6,49	-
L-arginina 600, i.p.	56,76 ± 2,88	17,13
LCU 600, v.o.	38,46 ± 7,95 ^a	43,85
L-arginina 600, i.p. + LCU 600, v.o.	47,46 ± 2,33 ^{ns}	30,71

Os animais foram tratados e 60 minutos após o tratamento oral ou 30 minutos após o tratamento intraperitoneal, administrou-se o marcador (0,2 mL/animal, v.o.). Vinte minutos após a administração deste, os animais dos respectivos grupos foram sacrificados. Os valores representam a média ± E.P.M. da distância percorrida pelo marcador (carvão) em relação ao comprimento total do intestino delgado e o percentual de inibição do trânsito gastrintestinal, expressos como percentagem (n=08). ^a $p < 0,01$ comparado ao grupo Controle e ^{ns} $p > 0,05$ comparado ao grupo tratado com LCU (ANOVA e Teste de Student-Newman-Keul).

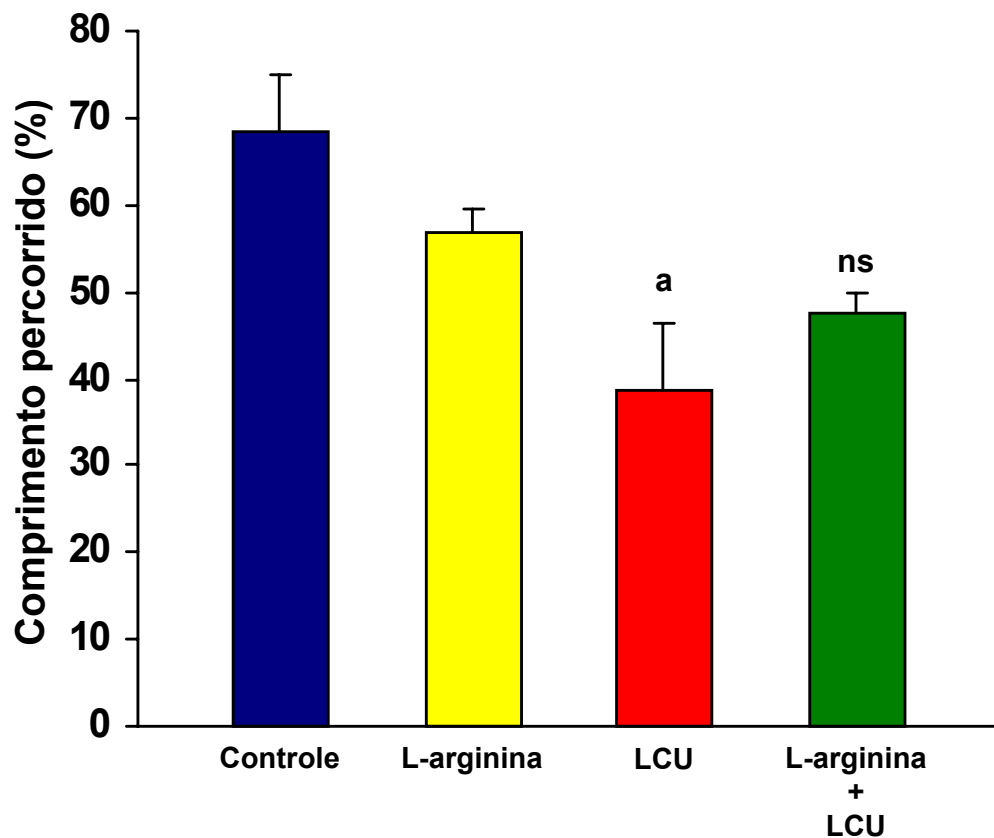


FIGURA 10. Efeito da L-arginina sobre a atividade do látex do *Croton urucurana* (LCU) no trânsito gastrointestinal de camundongos. Camundongos machos (n=08) foram tratados com veículo (Controle, 10 mL/kg, v.o.), L-arginina (600 mg/kg, i.p.), LCU (600 mg/kg, v.o.) ou L-arginina 30 min antes da administração de LCU, nas mesmas doses. Uma hora após o tratamento oral ou 30 min após o tratamento intraperitoneal, administrou-se o marcador (0,2 mL/animal, v.o.) e 20 min após a administração deste, os animais dos respectivos grupos foram sacrificados. As colunas representam a média \pm E.P.M. da distância percorrida pelo marcador (carvão) em relação ao comprimento total do intestino delgado, expressa como percentagem. ^a $p < 0,01$ comparado ao grupo Controle e ^{ns} $p > 0,05$ comparado ao grupo tratado com LCU (ANOVA e Teste de Student-Newman-Keul).

TABELA 10. Efeito da ioimbina sobre a atividade do látex do *Croton urucurana* (LCU) no trânsito gastrintestinal de camundongos.

Tratamento (mg/kg)	% Percorrido	% de Inibição
Controle (veículo, 10 mL/kg, v.o.)	74,90 ± 8,54	-
Ioimbina 1, i.p.	61,11 ± 2,04	18,41
Clonidina 0,1; v.o.	23,98 ± 3,12 ^a	67,98
LCU 600, v.o.	38,95 ± 4,67 ^a	47,99
Ioimbina 1, i.p. + Clonidina 0,1; v.o.	50,75 ± 5,85 ^b	32,24
Ioimbina 1, i.p. + LCU 600, v.o.	48,36 ± 4,75	35,43

Os animais foram tratados e 60 minutos após o tratamento oral ou 30 minutos após o tratamento intraperitoneal, administrou-se o marcador (0,2 mL/animal, v.o.). Vinte minutos após a administração deste, os animais dos respectivos grupos foram sacrificados. Os valores representam a média ± E.P.M. da distância percorrida pelo marcador (carvão) em relação ao comprimento total do intestino delgado e o percentual de inibição do trânsito gastrintestinal, expressos como percentagem (n=08). ^a $p < 0,001$ comparado ao grupo Controle e ^b $p < 0,01$ comparado ao grupo tratado com clonidina (ANOVA e Teste de Student-Newman-Keul).

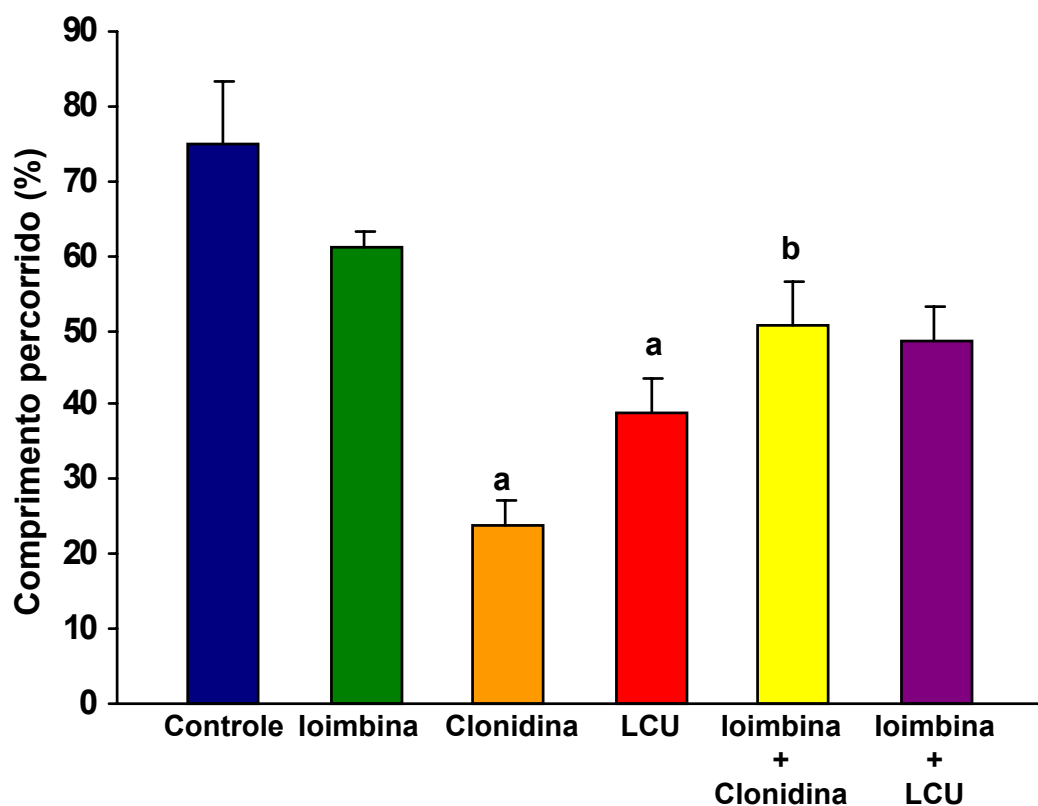


FIGURA 11. Efeito da ioimbina sobre a atividade do látex do *Croton urucurana* (LCU) no trânsito gastrointestinal de camundongos.

Camundongos machos (n=08) foram tratados com veículo (Controle, 10 mL/kg, v.o.), ioimbina (1 mg/kg, i.p.), clonidina (0,1 mg/kg, v.o.), LCU (600 mg/kg, v.o.) ou ioimbina 10 min antes da administração de clonidina ou LCU, nas mesmas doses. Uma hora após o tratamento oral ou 30 min após o tratamento intraperitoneal, administrou-se o marcador (0,2 mL/animal, v.o.) e 20 min após a administração deste os animais dos respectivos grupos foram sacrificados. As colunas representam a média \pm E.P.M. da distância percorrida pelo marcador (carvão) em relação ao comprimento total do intestino delgado, expressa como porcentagem. ^a $p < 0,001$ comparado ao grupo Controle e ^b $p < 0,01$ comparado ao grupo tratado com clonidina (ANOVA e Teste de Student-Newman-Keul).

4.2. TRÂNSITO GASTRINTESTINAL ESTIMULADO POR FISOSTIGMINA EM CAMUNDONGOS

A administração de fisostigmina (0,25 mg/kg, i.p.) aumentou de forma significativa ($p < 0,05$) a distância percorrida pelo marcador, passando esta de um valor de $61,32 \pm 3,00$ % do comprimento total do intestino, no grupo controle normal, para um valor de $80,44 \pm 4,22$ % no grupo controle fisostigmina (Tabela 11, Figura 12).

A Tabela 11 e a Figura 12 mostram que o pré-tratamento dos animais com atropina (5 mg/kg, v.o.) ou com atropina, na mesma dose, em associação ao LCU (600 mg/kg, v.o.), diminuiu a distância percorrida pelo marcador para $48,96 \pm 7,34$ % e $53,35 \pm 10,12$ %, respectivamente, em relação ao grupo controle fisostigmina ($80,44 \pm 4,22$ %), sendo esta inibição do trânsito considerada significativa ($p < 0,05$).

A administração do LCU na dose de 600 mg/kg, v.o., não foi capaz de alterar de forma significativa o efeito estimulatório exercido pela fisostigmina sobre o trânsito gastrointestinal. Neste grupo o marcador percorreu $77,80 \pm 8,21$ % do comprimento total do intestino, enquanto que no grupo controle fisostigmina o marcador percorreu $80,44 \pm 4,22$ % do mesmo.

TABELA 11. Efeito do látex do *Croton urucurana* (LCU) sobre o trânsito gastrointestinal estimulado por fisostigmina em camundongos.

Tratamento (mg/kg)	% Percorrido	% de Inibição
Controle Normal (veículo, 10 mL/kg, v.o.)	61,32 ± 3,00	-
Controle Fisostigmina 0,25; i.p.	80,44 ± 4,22 ^a	-
Atropina 5, v.o. + Fisostigmina 0,25; i.p.	48,96 ± 7,34 ^b	39,13
LCU 600, v.o. + Fisostigmina 0,25; i.p.	77,80 ± 8,21	3,28
Atropina 5, v.o. + LCU 600, v.o. + Fisostigmina 0,25; i.p.	53,35 ± 10,12 ^b	33,67

Os animais foram tratados e imediatamente após o tratamento receberam uma injeção intraperitoneal de fisostigmina (0,25 mg/kg), com exceção do grupo controle normal que recebeu o mesmo volume de água destilada (i.p.). Uma hora após o tratamento oral, administrou-se o marcador (0,2 mL/animal, v.o.). Vinte minutos após a administração deste, os animais dos respectivos grupos foram sacrificados. Os valores representam a média ± E.P.M. da distância percorrida pelo marcador em relação ao comprimento total do intestino delgado e o percentual de inibição do trânsito gastrointestinal, expressos como percentagem (n=08). ^a*p*<0,05 comparado ao grupo Controle Normal e ^b*p*<0,05 comparado ao grupo Controle Fisostigmina (ANOVA e Teste de Student-Newman-Keul).

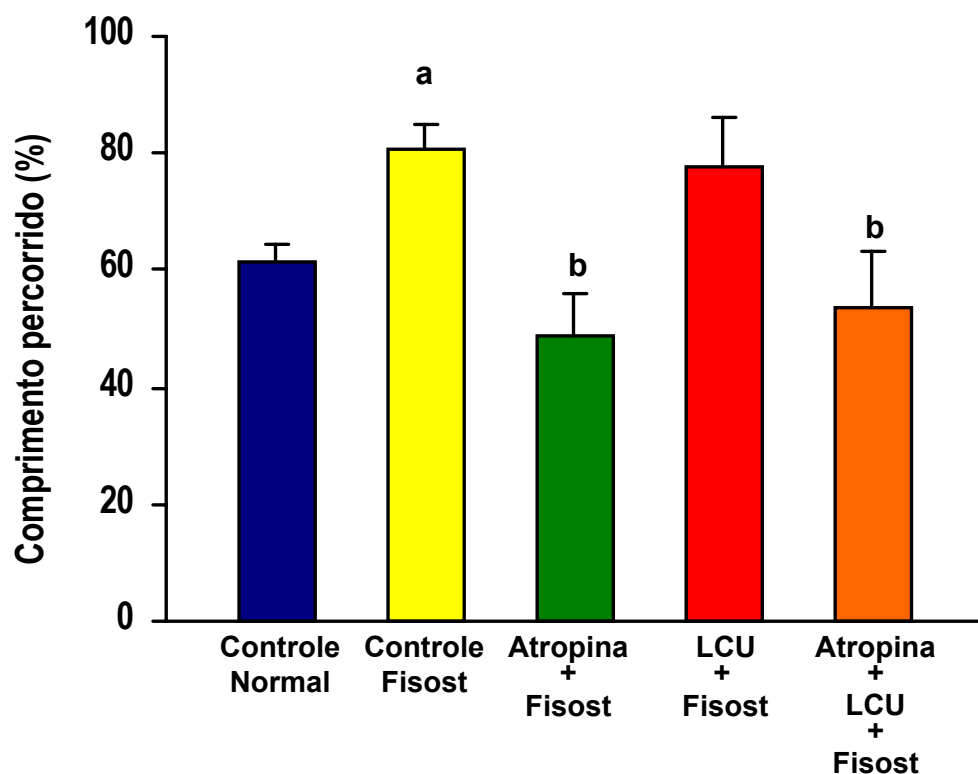


FIGURA 12. Efeito do látex do *Croton urucurana* (LCU) sobre o trânsito gastrointestinal estimulado por fisostigmina em camundongos. Camundongos machos (n=08), foram tratados oralmente com veículo (Controle Fisost, 10 mL/kg), atropina (Atropina+Fisost, 5 mg/kg), LCU (LCU+Fisost, 600 mg/kg) ou atropina em associação ao LCU, nas mesmas doses, (Atropina+LCU+Fisost). Imediatamente após o tratamento foi administrada fisostigmina (0,25 mg/kg, i.p.). O grupo Controle Normal foi tratado com veículo (10 mL/kg, v.o.) e recebeu, no lugar da fisostigmina, o mesmo volume de água destilada. Uma hora após o tratamento, administrou-se o marcador (0,2 mL/animal, v.o.) e 20 min depois os animais foram sacrificados. As colunas representam a média \pm E.P.M. da distância percorrida pelo marcador em relação ao comprimento total do intestino delgado, expressa como porcentagem. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo Controle Normal e ^b $p < 0,05$ comparado ao grupo Controle Fisostigmina (ANOVA e Teste de Student-Newman-Keul).

5. ATIVIDADE DO LÁTEX DO *Croton urucurana* BAILL. SOBRE A SECREÇÃO INTESTINAL

5.1. SECREÇÃO INTESTINAL INDUZIDA POR TOXINA DA CÓLERA EM CAMUNDONGOS

A Tabela 12 e a Figura 13 mostram que a toxina da cólera (15 µg/animal em 0,4 mL; v.o.) aumentou de forma significativa ($p < 0,001$) o volume de secreção intestinal de um valor de $642,12 \pm 65,73$ mg (Controle Veículo) para um valor de $1.301,28 \pm 82,98$ mg (Controle Toxina).

O pré-tratamento dos animais com LCU (600 mg/kg, v.o.) e clorpromazina (25 mg/kg, v.o.), 60 minutos antes da administração da toxina da cólera, reduziu de forma significativa ($p < 0,01$) o volume de secreção intestinal induzido pela toxina da cólera de um valor de $1.301,28 \pm 82,98$ mg (Controle Toxina) para $723,00 \pm 50,84$ e $930,37 \pm 77,80$ mg, respectivamente (Tabela 12 e Figura 13).

O pré-tratamento com LCU (600 mg/kg, v.o.), 60 minutos antes da administração de tampão Tris sozinho (0,4 mL/animal, v.o.), não alterou de forma significativa a secreção intestinal ($664,00 \pm 31,45$ mg) quando este valor foi comparado ao obtido no grupo controle veículo ($642,12 \pm 65,73$ mg).

TABELA 12. Efeito do látex do *Croton urucurana* (LCU) e da clorpromazina sobre a secreção intestinal induzida pela toxina da cólera em camundongos.

Tratamento (mg/kg)	Secreção Intestinal (mg)
Controle Veículo (veículo, 10 mL/kg, v.o.)	642,12 ± 65,73
Controle LCU 600, v.o.	664,00 ± 31,45
Controle Toxina (veículo, 10 mL/kg, v.o.)	1.301,28 ± 82,98 ^a
LCU 600, v.o.	723,00 ± 50,84 ^{bb}
Clorpromazina 25, v.o.	930,37 ± 77,80 ^b

Camundongos machos foram tratados oralmente com veículo (Controle Veículo, 10 mL/kg) ou LCU (Controle LCU, 600 mg/kg), 60 minutos antes da administração de tampão Tris sozinho (0,4 mL/animal, v.o.), ou com veículo (Controle Toxina, 10 mL/kg), LCU (600 mg/kg) ou clorpromazina (25 mg/kg) 60 minutos antes da administração de toxina da cólera (15 µg/animal em 0,4 mL de tampão Tris, v.o.). Os animais foram sacrificados por excesso de éter 6 horas após a administração da toxina da cólera ou tampão Tris sozinho. A secreção intestinal foi tomada, em miligramas, como a diferença entre os pesos do intestino tomados antes e após a eliminação do fluido intestinal. Foram utilizados 8 animais por grupo. Valores expressos como média ± E.P.M. da secreção intestinal (mg). ^a $p < 0,001$ comparado ao grupo Controle Veículo; ^b $p < 0,01$ e ^{bb} $p < 0,001$ comparado ao grupo Controle Toxina (ANOVA e Teste de Student-Newman-Keul).

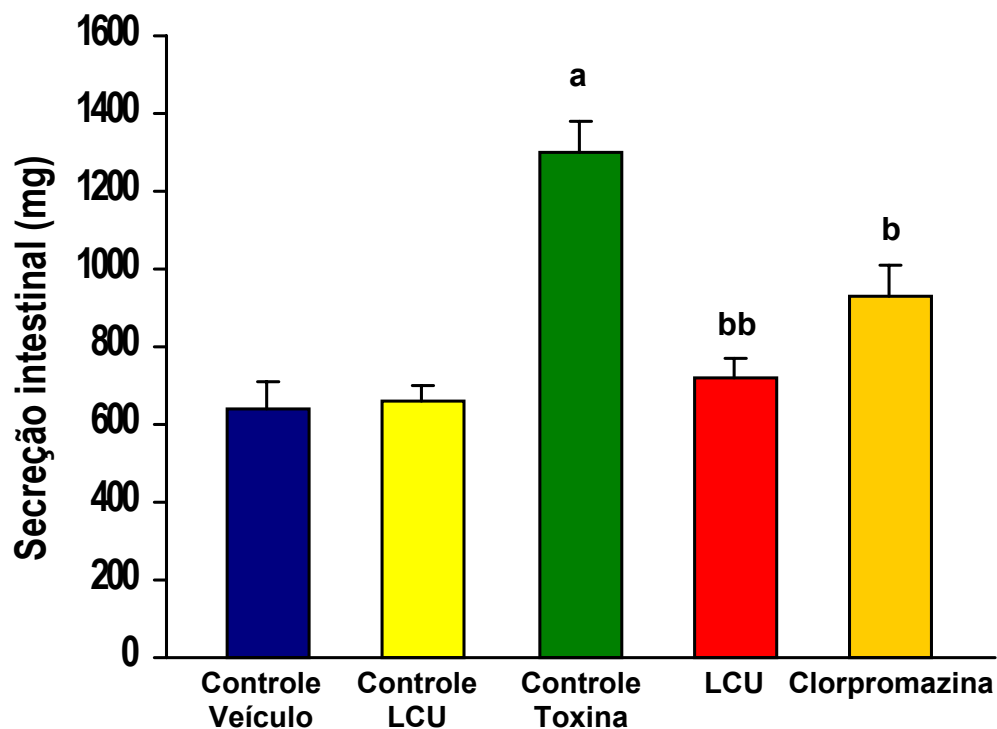


FIGURA 13. Efeito do látex do *Croton urucurana* (LCU) e da clorpromazina sobre a secreção intestinal induzida pela toxina da cólera em camundongos. Os animais (camundongos, machos, n=8) foram tratados oralmente com veículo (Controle Veículo, 10 mL/kg) ou LCU (Controle LCU, 600 mg/kg) 1 h antes da administração de tampão Tris sozinho (0,4 mL/animal, v.o.), ou com veículo (Controle Toxina, 10 mL/kg), LCU (600 mg/kg) ou clorpromazina (25 mg/kg) 1 h antes da administração de toxina da cólera (15 µg/animal em 0,4 mL de tampão Tris, v.o.). A secreção intestinal foi tomada, em miligramas, como a diferença entre os pesos do intestino tomados antes e após a eliminação do fluido intestinal. As colunas representam a média ± E.P.M. da secreção intestinal (mg) registrada em cada grupo. ^a $p < 0,001$ comparado ao grupo Controle Veículo; ^b $p < 0,01$ e ^{bb} $p < 0,001$ comparado ao grupo Controle Toxina (ANOVA e Teste de Student-Newman-Keul).

6. ATIVIDADE DO LÁTEX DO *Croton urucurana* BAILL. SOBRE A MOTILIDADE INTESTINAL

6.1. CONTRAÇÕES INDUZIDAS POR AGONISTAS EM JEJUNO ISOLADO DE RATO *IN VITRO*

A Tabela 13 mostra que nenhuma das três doses utilizadas do LCU foi capaz de alterar as respostas contráteis provocadas por cloreto de bário (1×10^{-3} M) ou acetilcolina ($5,5 \times 10^{-6}$ M), contudo, a resposta contrátil provocada por 5-HT ($0,47 \times 10^{-6}$ M) foi bloqueada, de forma significativa ($p < 0,05$), pelo LCU na dose de 300 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 13, Figura 14). O bloqueio foi revertido em cerca de 30 minutos após a lavagem do tecido. A média dos percentuais de inibição da resposta contrátil da 5-HT em presença do LCU, nas doses de 30, 100 e 300 $\mu\text{g/mL}$, foram $8,93 \pm 9,18$; $52,62 \pm 15,99$ e $76,72 \pm 7,71$ % respectivamente.

TABELA 13. Efeito do látex do *Croton urucurana* (LCU) sobre as contrações induzidas por agonistas em jejuno isolado de rato *in vitro*.

Agonista	Dose (M)	Altura (cm) da resposta contrátil antes e após incubação, por 3 min, com LCU nas doses (µg/mL)			
		Antes da incubação	30	100	300
Cloreto de bário	1×10^{-3}	$6,03 \pm 0,87$	$7,10 \pm 1,16$	$7,53 \pm 1,21$	$7,13 \pm 0,93$
Acetilcolina	$5,5 \times 10^{-6}$	$6,50 \pm 0,83$	$7,30 \pm 1,10$	$7,12 \pm 1,09$	$6,62 \pm 1,14$
5-HT	$0,47 \times 10^{-6}$	$5,22 \pm 1,52$	$4,40 \pm 0,81$	$1,97 \pm 0,40$	$1,02 \pm 0,25^*$

Os valores representam a média \pm E.P.M. da altura das curvas contráteis (cm) induzidas pelos agonistas na ausência ou presença do LCU em três diferentes concentrações, correspondente a quatro experimentos. $*p < 0,05$ comparado a altura apresentada pela curva inicial (controle), ou seja, na ausência do LCU (ANOVA e Teste Kruskal-Wallis).

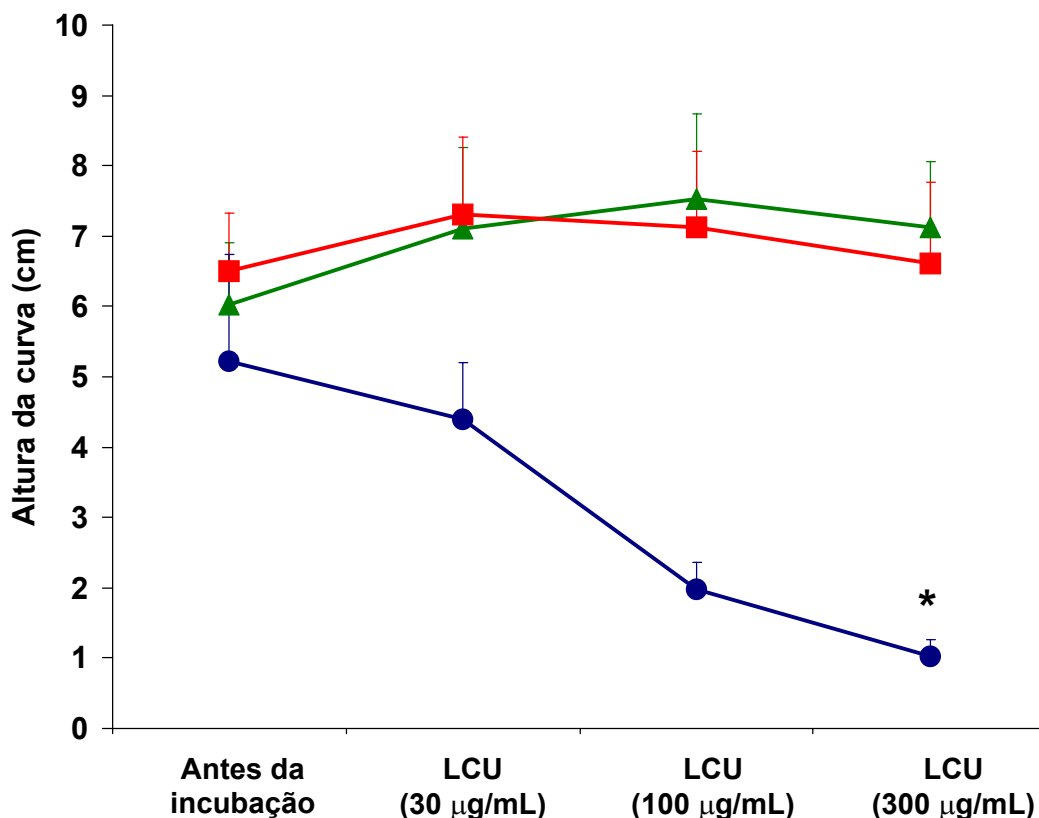


FIGURA 14. Efeito do látex do *Croton urucurana* (LCU) sobre as contrações induzidas por agonistas em jejuno isolado de rato *in vitro*. Os animais (ratos, machos, 160-180g) foram mantidos em jejum de sólidos por 24 h antes do sacrifício para a retirada de uma porção da parte proximal de seu jejuno (± 2 cm), que foi lavada com a solução nutritiva de Tyrode e imediatamente montada em um banho para órgão isolado. Após estabilização do órgão, foi iniciado o registro das respostas contráteis para Acetilcolina (■; $5,5 \times 10^{-6}$ M), Cloreto de Bário (▲; 1×10^{-3} M) e 5-HT (●; $0,47 \times 10^{-6}$ M), antes e após a incubação por 3 min em doses crescentes do LCU. As contrações foram registradas em quimógrafo através de alavanca isotônica de inscrição frontal. O gráfico representa a média \pm E.P.M. da altura das curvas de contração obtidas em quatro experimentos (cm). * $p < 0,05$ comparado ao resultado obtido antes da incubação, ou seja, na ausência do LCU (ANOVA e Teste Kruskal-Wallis).

Discussão

DISCUSSÃO

Existem alguns critérios fundamentais a serem seguidos no estudo de plantas. O primeiro deles é procurar informações na medicina popular para orientar o estudo farmacológico dos extratos. O segundo é utilizar o método mais simples possível para localizar e isolar compostos ativos e determinar se estes compostos são responsáveis pela atividade do extrato. Em nosso estudo, tendo como base seu uso popular, tivemos o objetivo de validar a utilização do látex do *Croton urucurana* Baill. como antidiarréico, estudando sua influência no trânsito gastrointestinal e secreção intestinal *in vivo* e na motilidade intestinal *in vitro*, utilizando modelos animais.

O nosso interesse na realização do trabalho surgiu devido ao grande impacto da diarreia sobre a mortalidade infantil. No nordeste do Brasil, por exemplo, mesmo com o uso da solução de reidratação oral, a diarreia persistente associada à desnutrição aguda continua sendo a principal causa de morbidade e mortalidade infantil (Guerrant et al., 1992).

Clinicamente a diarreia é uma consequência dos distúrbios da função intestinal na qual há uma secreção intestinal excessiva, absorção intestinal prejudicada e/ou rápido trânsito (Menezes et al., 1994). Portanto, a eficácia antidiarréica do látex do *Croton urucurana* Baill. foi estudada nos modelos experimentais de diarreia induzida por óleo de rícino em ratos (Mascolo et al., 1994) e camundongos (Izzo et al., 1992), no modelo de secreção intestinal induzida pela toxina da cólera (Richardson & Kuhn, 1986) e no trânsito gastrointestinal (Meli et al.,

1990) em camundongos, *in vivo*, e também na motilidade intestinal em jejuno isolado de rato, *in vitro*.

As doses utilizadas nos experimentos foram escolhidas com base em estudos preliminares realizados em nosso laboratório, onde utilizamos ratos e camundongos.

O *Croton urucurana* pertence a família *Euphorbiaceae*, e os mais potentes promotores de tumor, os ésteres de forbol, são extraídos de espécies pertencentes a esta família (Kinghorn *apud* Vaisberg et al., 1989). Contudo, o “Sangre de Grado”, obtido do *Croton lechleri* Muell. Arg., não apresentou atividade carcinogênica ou promotora de tumor após 17 meses de tratamento, em modelo animal usando camundongos (Vaisberg et al., 1989). Isso nos leva a acreditar que o “Sangre de Grado” não apresenta em sua composição quantidade considerável destes ésteres, além disso, os estudos até então realizados com o *Croton urucurana* não demonstraram a presença de ésteres de forbol, diterpenos com atividade carcinogênica (Kupchan et al., 1976; Schmidt *apud* Farias et al., 1996), o que é favorável à utilização terapêutica deste como antidiarréico.

No teste de toxicidade aguda, a dose letal do LCU para 50 % dos animais (DL_{50}), administrada por via oral, foi de $5,20 \pm 0,13$ g/Kg. No presente estudo, as doses utilizadas para tratamento com o LCU, definidas após estudos preliminares em nosso laboratório, foram de 400, 600 e 800 mg/kg, correspondendo a 1/13; 1/8,6 e 1/6,5 da DL_{50} , respectivamente. Estes achados indicam que o látex apresenta baixa toxicidade.

Os animais tratados com altas doses do LCU (6, 7 e 8 g/kg) apresentaram sedação. Talvez este efeito seja devido a uma depressão do SNC ocasionada pelo

LCU. A taquipnéia seguida de cianose de extremidades apresentada por alguns desses animais poderia ser explicada por ação do LCU no aparelho respiratório, ocorrendo severa broncoconstrição, porém, serão necessários estudos mais detalhados para confirmar algum efeito do LCU no SNC ou aparelho respiratório.

A analgesia observada pela ausência de reação do animal ao teste de pressão na cauda, realizado com pinça, pode ser explicada pela atividade analgésica do látex descrita na medicina popular e confirmada por Peres et al. (1998) no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos. Segundo Peres et al. (1998), o *C. urucurana* apresenta alguns compostos com atividade analgésica, tais como campesterol, stigmasterol, β -sitosterol, ácido acetil-aleurítico, catequinas, galocatequinas e β -sitosterol-glucosídeo. Tal atividade pode ser favorável ao uso do LCU para o tratamento da diarreia, tendo em vista que alguns casos de diarreia encontram-se associados à cólica abdominal.

A atividade antidiarréica do LCU foi estudada em modelos de diarreia induzida por óleo de rícino. O óleo de rícino é um laxativo efetivo (Gaginella & Bass, 1978). A diarreia induzida por ele é atribuída ao seu princípio ativo, o ácido ricinoléico. O óleo de rícino é hidrolisado na parte superior do intestino delgado em ácido ricinoléico, um irritante local que produz diminuição da absorção e aumento da secreção, da motilidade e do trânsito intestinal (Menezes et al., 1994). O início de ação é imediato e prossegue até que o composto seja excretado pelo cólon. Vários mediadores parecem estar envolvidos na indução da diarreia pelo óleo de rícino.

O óleo de rícino produz seu efeito laxativo em associação com a liberação de prostaglandinas (Rachmilewitz et al., 1980; Autore et al., 1984; Capasso et al., 1986) e fator ativador de plaquetas (PAF) (Pinto et al., 1989 e 1992), aumento da permeabilidade da mucosa (Farack & Nell, 1984), injúria do epitélio (Saunders et al., 1977 e 1978) e outros efeitos não específicos. O AMP cíclico (AMPc) também parece estar envolvido na secreção intestinal como resposta ao ácido ricinoléico (Racusen & Bindes *apud* Mascolo et al., 1994). Além do NO, prostaglandinas e PAF, existem evidências da participação de taquicininas (NK₁ e NK₂) na diarreia induzida por óleo de rícino (Crocì et al., 1997). Os autores deste estudo, realizado em ratos, propõem que a ativação dos receptores de taquicininas pelo óleo de rícino pode liberar PAF e NO, ambos contribuindo para o prejuízo no balanço de fluidos do intestino e para danos na mucosa. Portanto, fica claro que a ação do óleo de rícino como laxativo envolve uma complexa interação entre vários mediadores endógenos.

O aumento da permeabilidade da mucosa intestinal (Gaginella et al., 1977) e a liberação de prostaglandinas pelos enterócitos, induzida pelo ácido ricinoléico, ocorre através de um mecanismo dependente de cálcio (Capasso et al., 1985).

O PAF parece estar envolvido na atividade secretória do óleo de rícino, uma vez que foi mostrado que o antagonista do PAF, SR27417, reduz a incidência de diarreia induzida por óleo de rícino em ratos (Crocì et al., 1997). Tem sido mostrado que o PAF exerce uma série de efeitos sobre o intestino, incluindo contração da musculatura gastrointestinal e indução de erosões hemorrágicas da mucosa gastrointestinal (Campbell & Halusshka *apud* Izzo et al., 1998) e ainda estimulação da secreção de ânions em modelos animais (Hinterleitner et al. *apud* Izzo et al., 1998).

Outro mediador possivelmente envolvido no efeito laxativo do óleo de rícino é o NO. Este estimula a secreção intestinal (MacNaughton et al., 1992 e 1993; Wilson et al., 1993) e relaxa a musculatura lisa gastrintestinal (Stark et al., 1991; Ward et al., 1992), este último efeito parece aumentar o trânsito intestinal e contribuir para um efeito laxativo (Gullikson & Bass *apud* Izzo et al., 1994). O NO está envolvido em alterações da motilidade intestinal induzida pelo óleo de rícino (ácido ricinoléico) tanto *in vitro* (Izzo et al., 1993) quanto *in vivo* (Mascolo et al., 1994). Tal influência do NO sobre a motilidade intestinal foi observada no intestino delgado de ratos (Calignano et al., 1992) e cães (Stark et al., 1993) e no intestino grosso de cães (Stark et al., 1993) e humanos (Boechxstaens et al., 1993; Keef et al., 1993).

A NOS é responsável pela geração de NO a partir da L-arginina (Moncada et al., 1991). Esta enzima existe na forma constitutiva e indutiva em muitos tecidos (Moncada et al., 1991; Langrehr et al., 1993). A musculatura intestinal de ratos e cães é inervada por neurônios que contêm NOS (Kostka et al., 1993; Nichols et al., 1993), o que dá mais um suporte ao possível papel do NO na regulação da motilidade e secreção intestinal.

Mascolo et al., em seus estudos sobre a influência do NO na motilidade intestinal, mostraram que o inibidor reversível da NOS, L-NAME (Rees et al., 1990), inibe a secreção intestinal de água e eletrólitos induzida por óleo de rícino em ratos (Mascolo et al., 1993 e 1994). Outro inibidor reversível da NOS, L-NMMA (Rees et al., 1990), previne ou reduz a diarreia induzida por óleo de rícino (Mascolo et al., 1993). Estes achados sugerem que o NO pode estar envolvido na atividade diarreica do óleo de rícino. Em modelos animais utilizando ratos tratados com óleo de rícino, o L-NAME exacerbou os danos causados no intestino sugerindo que o NO exerce uma

atividade protetora sobre o intestino (Capasso et al. *apud* Izzo et al., 1998). Contudo, o fato do L-NAME bloquear o efeito diarréico do óleo de rícino ao mesmo tempo em que agrava a injúria à mucosa intestinal sugere que estes dois eventos não têm correlação de causa e efeito.

O NO também parece estar envolvido no efeito laxativo do bisacodil e da fenolftaleína (Gaginella et al., 1994), do sulfato de magnésio (Izzo et al., 1994), e da sene e cáscara sagrada (Izzo et al., 1996).

As fontes para liberação de NO pelos laxativos incluem as células epiteliais (Tepperman et al., 1993), neurônios mioentéricos e/ou da submucosa (Sanders & Ward, 1992; Kostka et al., 1993; Nichols et al., 1993), células do músculo liso (Grider et al., 1992) e células endoteliais da microvasculatura (Palmer et al., 1988).

O NO estimula a guanilato ciclase intestinal (Ward et al., 1992). A elevação de GMP cíclico (GMPc) intracelular está associada com o relaxamento do músculo liso (Katsuki et al., 1977) e com a secreção intestinal (Brasitus et al., 1976). Apesar de vários estudos terem sido publicados sobre a atividade secretória do NO, o papel do mesmo sobre o intestino parece ser controverso: foi revelado um efeito pró-absortivo do NO em estudos realizados em câmara de Üssing utilizando íleo de camundongo (Rao et al., 1994), íleo de rato (Mailman, 1994), jejuno de rato (Schirgi-Deden & Beubler, 1995 e 1996), dentre outros. Além destes estudos, Beubler & Schirgi-Deden (1997) mostraram que a administração endovenosa de L-arginina ou doadores de NO bloqueia a secreção intestinal, em ratos, induzida por 5-HT ou pela toxina da cólera, além de aumentar o efeito anti-secretório da solução de reidratação oral, no modelo de alça de jejuno ligada *in vivo*. Recentemente Turvill et al. (1999) esclareceram, em parte, esta controversa quando concluíram em seus estudos que

o NO apresenta uma dualidade de papéis na secreção intestinal induzida pela toxina da cólera, agindo tanto aumentando a absorção quanto a secreção intestinal.

Apesar do fato de inúmeros mecanismos terem sido propostos para o efeito laxativo do óleo de rícino, ainda não foi possível definir com clareza seu mecanismo de ação, contudo, ele tem sido uma boa ferramenta no estudo dos sintomas associados à diarreia (redução da consistência das fezes, aumento da frequência de defecação e eliminação excessiva de fezes).

No modelo de diarreia induzida por óleo de rícino em camundongos o registro das alterações na quantidade de fezes eliminadas e na perda de peso é utilizado como indicador do ritmo de propulsão intestinal, baseado na suposição de que uma redução na passagem de fezes e uma concomitante menor perda de peso representa redução na propulsão do conteúdo intestinal ou constipação (Shook et al., 1989).

A administração oral do LCU (400, 600 e 800 mg/kg) produziu significativa atividade antidiarréica. Na tentativa de esclarecer se a atividade antidiarréica observada estava associada a uma possível inibição da síntese do NO ou a um efeito sobre os receptores opióides presentes no trato gastrointestinal, levando a uma redução do trânsito e das secreções intestinais, utilizamos L-arginina, substrato para síntese do NO, e naloxona, antagonista não seletivo dos receptores opióides. Contudo, os resultados mostram que a L-arginina e a naloxona falharam em reverter o efeito do LCU. Estas observações nos permitem sugerir que a atividade antidiarréica do LCU não depende de mecanismo nitriérgico ou opióide.

Orlandi-Mattos et al. (2000) mostraram que o LCU apresenta potente atividade antiinflamatória e que este efeito deve-se em parte à inibição da resposta de mediadores da inflamação, como bradicinina, prostaglandina E₂ e substância P, bem como à inibição da migração celular para o foco inflamatório. Talvez a atividade antidiarréica do látex deva-se à inibição das ações da prostaglandina E₂, uma vez que é sabido que as prostaglandinas estão envolvidas na indução da diarreia pelo óleo de rícino (Rachmilewitz et al., 1980; Autore et al., 1984; Capasso et al., 1986).

Com base na análise fitoquímica da planta, outra hipótese pode ser elaborada na tentativa de esclarecer o mecanismo da atividade antidiarréica do LCU, pois o estudo fitoquímico do látex revelou a presença de taninos. Plantas que contêm taninos em sua composição podem apresentar um efeito antidiarréico, uma vez que estas substâncias precipitam as proteínas dos enterócitos, reduzindo os movimentos peristálticos e a secreção intestinal (Almeida et al., 1995). A camada formada pelo precipitado de proteínas na superfície da mucosa dos enterócitos também inibe o desenvolvimento de microorganismos, explicando portanto a ação anti-séptica dos taninos, que contribui para o tratamento da diarreia (Costa *apud* Almeida et al., 1995). Os taninos, portanto, são anti-secretórios e também são conhecidos por inibirem os efeitos estimulantes de ligantes endógenos sobre a musculatura lisa do intestino (Menezes et al., 1994). A análise fitoquímica também revelou a presença de antocianidinas e catequinas, substâncias que podem reduzir a motilidade e a secreção intestinal (Okuda et al., 1989).

Outro constituinte ativo do látex que poderia explicar sua atividade antidiarréica é o composto SP-303, isolado primeiramente do *Croton lechleri* Muell. Arg., uma proantocianidina com comprovada ação antiviral (Ubillas et al., 1994). É

sabido que outras espécies, como o *C. urucurana*, também produzem o SP-303 (Ubillas et al., 1994). O composto SP-303 tem se mostrado bastante promissor no tratamento da diarreia. Os resultados do ensaio clínico de 2ª fase utilizando o produto SB-300 (Shaman Pharmaceuticals, Inc.), cujo principal constituinte é o composto SP-303, foram apresentados na “XII World AIDS Conference Geneva”, em junho de 1998, por Holodniy. Em seus estudos utilizando indivíduos soropositivos (HIV+), apresentando diarreia, Holodniy mostrou que o SP-303 reduziu não apenas a quantidade de fezes eliminadas pelos pacientes como também a frequência de defecação.

O composto SP-303 apresenta em sua composição (+)-catequina, (+)-galocatequina, (-)-epicatequina e (-)-galoepicatequina, com predomínio da (+)-galocatequina e da (-)-galoepicatequina (Ubillas et al., 1994). Este composto também mostrou-se eficaz contra a secreção intestinal induzida pela toxina da cólera *in vivo*, em camundongos, e a secreção de Cl⁻ mediada por AMPc *in vitro* (Gabriel et al., 1999).

Para estabelecer os efeitos do LCU na motilidade intestinal, foram realizados experimentos para verificar sua influência no trânsito gastrointestinal de camundongos *in vivo* e em segmentos de intestino delgado de rato *in vitro*.

O marcador à base de carvão ativado utilizado no modelo de trânsito gastrointestinal tem sido usado por mais de 60 anos como uma ferramenta simples para avaliação do efeito de laxativos (Macht & Barba-Gose *apud* Gagarella et al., 1994). Este método é apenas um indicador da distância máxima percorrida pelo marcador, ou seja, o método não fornece informações sobre a quantidade de marcador encontrada em cada ponto ao longo do intestino e também não faz

distinção entre um efeito de esvaziamento no estômago ou um efeito proveniente de alteração no trânsito intestinal.

Nossos achados mostram que o marcador percorreu mais rapidamente nos animais tratados com fisostigmina (Controle fisostigmina) do que nos animais do grupo controle normal. Além disso, o LCU mostrou reduzir significativamente o trajeto percorrido pelo marcador, quando comparado ao grupo controle, o que indica uma redução do trânsito gastrointestinal. Este efeito pode auxiliar na redução no número de evacuações, além de favorecer a absorção de água em virtude da lentidão da passagem do conteúdo intestinal, aumentando a viscosidade do bolo fecal, e sendo, portanto, importante no controle da diarreia. É importante lembrar que isto pode ter ocorrido por um efeito no estômago e/ou no intestino.

Para tentar esclarecer o mecanismo envolvido neste efeito inibitório do látex sobre o trânsito gastrointestinal, alguns agentes farmacológicos foram utilizados. A droga utilizada como padrão foi a morfina. Os efeitos gastrointestinais da morfina são primariamente mediados por receptores opióides μ e δ no intestino. A morfina diminui a motilidade gástrica, aumentando sensivelmente o tempo de esvaziamento gástrico, inibe a transferência de líquidos e eletrólitos para a luz intestinal, através de ações sensíveis à naloxona na mucosa intestinal e no sistema nervoso central, e reduz ou suprime as ondas peristálticas propulsivas do cólon, além de aumentar o tono do mesmo até o nível de espasmo. O tono do esfíncter anal também é aumentado. Além de morfina e naloxona, também foram utilizados L-arginina, clonidina e ioimbina. A L-arginina é um substrato para a síntese de NO. O NO relaxa a musculatura lisa gastrointestinal (Stark et al., 1991; Ward et al., 1992) e este efeito parece aumentar o trânsito intestinal e contribuir para um efeito laxativo (Gullikson &

Bass *apud* Izzo et al., 1994). O NO age estimulando a guanilato ciclase intestinal (Ward et al., 1992). A elevação de GMP cíclico (GMPc) intracelular está associada com esse relaxamento do músculo liso (Katsuki et al., 1977) e também com a secreção intestinal (Brasitus et al., 1976). Os agonistas α_2 -adrenérgicos, como a clonidina, têm uso limitado no tratamento da diarreia, estas drogas podem modificar o transporte na mucosa intestinal, além de reduzir o trânsito (Schiller, 1995).

Naloxona, antagonista opióide não seletivo, L-arginina, substrato para a síntese de NO, e ioimbina, droga predominantemente antagonista dos receptores α_2 -adrenérgicos (Starke et al. *apud* Tadano et al., 1992), falharam em reverter, de forma significativa, o efeito inibitório do LCU sobre o trânsito gastrintestinal. Contudo, pudemos observar uma tendência por parte da naloxona em reverter o efeito do LCU. No modelo de trânsito gastrintestinal estimulado por fisostigmina, o LCU não foi capaz de reverter o aumento do trânsito gastrintestinal induzido pela fisostigmina. Nossos resultados mostram que o LCU apresenta atividade inibitória sobre o trânsito gastrintestinal, entretanto este efeito não depende de mecanismo opióide, nitriérgico, α_2 -adrenérgico ou colinérgico.

Ao tentarmos avaliar uma possível atividade α_2 -adrenérgica do LCU, o grupo tratado com o látex foi comparado ao tratado com clonidina, um agonista α_2 -adrenérgico, droga considerada antidiarréica (Rabbani et al., 1982). A maioria das evidências sugerem que o efeito antidiarréico da clonidina resulta de ativação dos receptores α_2 -adrenérgicos localizados em nervos mioentéricos (Vizi *apud* Tadano et al., 1992) e/ou células do músculo liso intestinal (Doherty & Hancock *apud* Tadano et al., 1992). Não foram demonstradas ações antidiarréicas centrais da clonidina (Doherty & Hancock *apud* Tadano et al., 1992).

O efeito inibitório do LCU sobre o trânsito gastrointestinal talvez seja devido a presença de flavonóides em sua composição. Os flavonóides encontram-se amplamente distribuídos na natureza. Vários deles têm mostrado inibir o trânsito e a secreção intestinal (Di Carlo et al., 1993). Foi mostrado que a quercetina, o flavonóide mais ativo, inibe as contrações do íleo de cobaio estimuladas por agonista ou por anafilaxia (Fanning et al., 1983). Outros flavonóides também mostraram atividade semelhante (Middleton & Drzewiecki, 1984; Capasso et al., 1988 e 1991). Além dos flavonóides, os taninos também podem estar contribuindo para a atividade do LCU sobre o trânsito gastrointestinal. Plantas que contêm taninos em sua composição podem inibir o trânsito, uma vez que estas substâncias reduzem os movimentos peristálticos, além de reduzir a secreção intestinal (Almeida et al., 1995).

O SP-303, outro constituinte ativo do “Sangre de Grado”, também pode ter sua participação nesta atividade. Os resultados do ensaio clínico de 2ª fase utilizando o produto SB-300 (Shaman Pharmaceuticals, Inc.), cujo principal constituinte é o composto SP-303, foram apresentados na “XII World AIDS Conference Geneva”, em junho de 1998, por Holodniy. Como já comentado anteriormente, em seus estudos utilizando indivíduos soropositivos (HIV+), apresentando diarreia, Holodniy mostrou que o SP-303 reduziu não apenas a quantidade de fezes eliminadas pelos pacientes como também a frequência de defecação. Tal redução na frequência de defecação pode ter ocorrido por uma lentificação do trânsito gastrointestinal pelo composto SP-303.

Realizamos em nosso laboratório um estudo preliminar utilizando o modelo de edema de pata induzido por 5-HT, nesse estudo, cujo resultado foi avaliado por

observação visual, o LCU aparentemente não inibiu a formação do edema de pata induzido pela 5-HT, porém, no modelo de contrações induzidas por agonistas em jejuno isolado de rato *in vitro*, o LCU inibiu as contrações induzidas por 5-HT, enquanto falhou em inibir as contrações induzidas pelos outros dois agonistas, cloreto de bário e acetilcolina. Talvez o LCU esteja exercendo um bloqueio sobre os receptores da 5-HT impedindo a ação da mesma, porém, estudos mais detalhados utilizando modelos experimentais *in vivo* e alguns antagonistas seletivos para os receptores de 5-HT, como 5-HT₂, 5-HT₃ e 5-HT₄, devem ser ainda realizados para esclarecer melhor um possível envolvimento dos receptores 5-HT no mecanismo de ação do LCU sobre a motilidade intestinal.

Nos últimos dez anos, foi revelada a existência de quinze subtipos de receptores 5-HT, que podem ser divididos em sete subfamílias (5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆ e 5-HT₇) (Gerhardt & Heerikhuizen, 1997). O trato gastrintestinal é um dos maiores depósitos de 5-HT nos mamíferos (Thompson *apud* Banner et al., 1996). Dentre as muitas atividades propostas para este estoque de 5-HT está o envolvimento nos mecanismos de pelo menos alguns tipos de diarreia aquosa e distúrbios de defecação. Estes efeitos são devido a um aumento na atividade propulsiva do intestino e/ou um aumento no volume de fluido acumulado na luz do intestino. Contudo, sabe-se muito pouco sobre a natureza dos receptores de 5-HT envolvidos nesta atividade, conseqüentemente, o verdadeiro papel da 5-HT na fisiopatologia da diarreia ainda não é bem conhecido (Banner et al., 1996).

Banner et al. (1996) mostraram que os antagonistas dos receptores 5-HT₄, DAU6285, SDZ205-57 e SB204070, administrados subcutaneamente, não alteraram a defecação nem a fluidez das fezes em camundongos normais, porém inibiram de

forma dose-dependente o aumento da defecação e da fluidez das fezes induzido por 5-hidroxitriptofano, precursor da 5-HT. Estes resultados sugerem que o receptor 5-HT₄ não está envolvido no mecanismo normal de defecação, contudo parece ser recrutado apenas em condições patológicas. Resultados semelhantes foram obtidos por Sanger et al. (2000) usando o antagonista do receptor 5-HT₄, SB207266. Bourin et al. (1996) mostraram que o uso de antagonistas dos receptores 5-HT₃ (ondansetron, granisetron, tropisetron) e, em menor intensidade, dos receptores 5-HT₂ (ritanserina), inibiu a diarreia induzida por 5-hidroxitriptofano em camundongos, confirmando a participação também destes receptores na diarreia induzida por 5-HT.

Utilizamos a toxina da cólera para estabelecer uma possível atividade anti-secretória intestinal do LCU. Apesar de usualmente acharmos que o intestino delgado tem apenas a função absorptiva, ele também tem a capacidade de secretar água e eletrólitos. Esta capacidade secretória é demonstrada de forma impressionante pela diarreia produzida pela toxina da cólera, que é quase que completamente originada no intestino delgado (Carpenter et al. *apud* Field, 1971). A secreção intestinal desempenha importante papel não apenas na cólera, mas também em outras desordens associadas à diarreia.

A 5-HT é um importante mediador da secreção intestinal induzida pela toxina da cólera (Beubler & Horina, 1990). Além da 5-HT, também estão envolvidos na patogênese da cólera o AMPc, prostaglandinas e a função de estruturas neuronais.

Segundo estudos realizados por Beubler & Horina (1990), utilizando jejuno de rato *in vivo*, parece que a toxina da cólera pode desencadear a liberação de 5-HT pelas células enterocromafins. Os autores supõem que a 5-HT pode então causar a formação de prostaglandina E₂ via receptores 5-HT₂ e a ativação de estruturas

neurais via receptores 5-HT₃. Estes dois efeitos podem finalmente levar a uma abundante secreção de fluido que pode ser totalmente bloqueada pela combinação de bloqueadores dos receptores 5-HT₂ e dos receptores 5-HT₃. A participação destes dois subtipos de receptores na hipersecreção induzida pela toxina da cólera também foi confirmada por Hansen & Skadhauge (1994).

Peterson et al. (1993) também estudaram os mediadores envolvidos no aumento da secreção intestinal induzido pela toxina da cólera e concluíram que a toxina da cólera estimula a síntese e a liberação tanto de AMPc, quanto de prostaglandina E₂, e ainda que o AMPc parece causar a liberação de 5-HT pelas células cromafins.

Estudos recentes realizados por Peregrin et al. (1999 e 1997) concluíram que a secreção intestinal induzida pela toxina da cólera é atenuada ou abolida por bloqueadores dos canais de cálcio do tipo L ou N e que a atividade anti-secretória intestinal dos bloqueadores dos canais de cálcio do tipo L é, em parte, explicada pela inibição da liberação de 5-HT induzida pela toxina da cólera. Ou seja, mais uma vez foi mostrado o envolvimento da 5-HT na secreção intestinal induzida pela toxina da cólera.

O NO também parece estar envolvido na secreção intestinal induzida pela toxina da cólera. Janoff et al. (1997) concluíram em seus estudos que a infecção sintomática de humanos pelo *V. cholerae* induz a produção de NO e que, em modelo de alça ileal de coelho, a toxina da cólera estimula significativamente a produção de NO em associação com o aumento na atividade local de NOS Ca²⁺-dependente. A toxina da cólera também estimula a secreção intestinal por outros mecanismos como a estimulação da citocina pró-inflamatória IL-6 (McGee et al., 1993), VIP (Nilson et

al., 1983; Jiang et al., 1993) e pela promoção da permeabilidade intestinal (Triadafilopoulos et al., 1989).

O SP-303, um constituinte ativo do “Sangre de Grado” citado anteriormente, também pode ter sua participação nesta atividade, uma vez que este se mostrou eficaz contra a secreção intestinal induzida pela toxina da cólera *in vivo*, em camundongos, e a secreção de Cl^- mediada por AMPc *in vitro* (Gabriel et al., 1999).

Nossos resultados mostram que a inibição da secreção intestinal induzida pelo LCU foi maior que aquela mostrada pela clorpromazina, uma droga conhecida por seu efeito anti-secretório intestinal em pacientes com cólera (Rabbani et al., 1982). Além disso, o LCU parece não interferir no mecanismo normal de secreção do intestino. A inibição da secreção intestinal em resposta ao LCU pode ser devida a inibição das respostas da prostaglandina E_2 , uma vez que o LCU mostrou inibir o edema de pata induzido pela prostaglandina E_2 em camundongos (Orlandi-Mattos et al., 2000) e a mesma está envolvida no aumento da secreção intestinal induzido pela toxina da cólera (Beubler & Horina, 1990; Peterson et al., 1993). Outra explicação para a atividade anti-secretória do LCU, além de uma possível participação do composto SP-303, já comentado anteriormente, seria um papel dos flavonóides presentes em sua composição, pois estes têm mostrado inibir a secreção intestinal (Di Carlo et al., 1993), ou ainda a participação dos taninos, substâncias que também reduzem a secreção intestinal (Almeida et al., 1995). Além de todas essas possibilidades, os resultados obtidos no modelo de contrações induzidas por agonistas em jejuno isolado de rato, onde a incubação com o LCU levou a uma inibição da contração induzida pela 5-HT, nos leva a gerar a hipótese de que o LCU poderia estar agindo como antagonista dos receptores de 5-HT inibindo a secreção

intestinal induzida pela toxina da cólera, já que a participação da 5-HT neste mecanismo foi estabelecida (Beubler & Horina, 1990).

Em resumo, os resultados obtidos em nosso estudo sugerem que o látex do *Croton urucurana* Baill. apresenta atividade antidiarréica, confirmando seu uso popular, e este pode ser explorado como uma alternativa para o tratamento da diarreia, sozinho ou em combinação com a solução de reidratação oral.

Conclusões

CONCLUSÕES

- ✎ A análise fitoquímica do LCU demonstrou a presença de compostos como taninos, catequinas e antocianidinas que apresentam propriedade antidiarréica já esclarecida na literatura. É provável que o LCU demonstre melhor desempenho se for testado em uma fração contendo estes constituintes.
- ✎ O LCU inibiu a diarreia induzida por óleo de rícino, o trânsito gastrointestinal, a secreção intestinal induzida pela toxina da cólera e a contratilidade intestinal provocada pelo agonista 5-HT, demonstrando assim, uma atividade antidiarréica.
- ✎ No modelo de diarreia induzida por óleo de rícino em ratos, os resultados mostram que a atividade antidiarréica do LCU não depende de mecanismo nitriérgico ou opióide.
- ✎ Os dados apresentados nos modelos de trânsito gastrointestinal indicam que a atividade inibitória do LCU sobre o mesmo não depende de mecanismo opióide, nitriérgico, α_2 -adrenérgico ou colinérgico.

Summary

SUMMARY

The red sap (Dragon's Blood ou Sangre de Grado) extracted from some *Croton* species is used in folk medicine for the treatment of cancer, rheumatism, wounds, ulcers, diarrhoea and to combat infections. The aim of this study is to evaluate a possible antidiarrhoeic activity of the sap extracted from *Croton urucurana* Baill. (SCU) and to elucidate the possible mechanism involved on this activity, explaining and justifying the popular use of this plant for the treatment of diarrhoea. The experimental models used were, castor oil-induced diarrhoea in rats and mice, gastrointestinal transit and cholera toxin-induced intestinal secretion in mice, and contractile responses evoked by agonists (acetylcholine, barium chloride and 5-HT) in isolated rat jejunum. SCU (400, 600 and 800 mg/kg, p.o.) produced a significant antidiarrhoeic activity. However, in the castor oil-induced diarrhoea model, in rats, neither L-arginine (600 mg/kg, i.p.) nor naloxone (2 mg/kg, s.c.) reverted the SCU (800 mg/kg, p.o.) antidiarrhoeic activity. On the gastrointestinal transit SCU produced a significant ($p < 0,01$) inhibitory effect at all the test doses employed. However, naloxone (2 mg/kg, s.c.), L-arginine (600 mg/kg, i.p.) and ioimbine (1 mg/kg, i.p.) failed to mitigate in a significant manner, this inhibitory effect of SCU. When tested on physostigmine-induced gastrointestinal transit, SCU (600 mg/kg, p.o.) showed no significant inhibition indicating absence of anticholinergic action. The cholera toxin-induced intestinal secretion was inhibited by SCU (600 mg/kg, p.o.) and this inhibition was greater than that observed with chlorpromazine (25 mg/kg, p.o.), an established antisecretory drug. In isolated rat jejunum, SCU markedly inhibited the contractile responses evoked by 5-HT, but failed to modify the contractile responses of other two agonists, barium chloride and acetylcholine. SCU showed low toxicity, the LD₅₀ (lethal dose for 50% of the animals) registered was $5,20 \pm 0,13$ g/Kg, per oral route. In conclusion, the results of this study suggest that the sap extracted from *Croton urucurana* presents antidiarrhoeic activity, confirming its popular use, and can be explored as an alternative treatment for diarrhoea, alone or in combination with the oral rehydration solution. Though, its mechanism of action is unclear, but its effect is independent of opioid, cholinergic, α_2 -adrenergic or nitriergic mechanism.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALMEIDA, C. E.; KARNIKOWSKI, M. G. O.; FOLETO, R.; BALDISSEROTTO, B. Analysis of the antidiarrhoeic effect of plants used in popular medicine. **Rev. Saúde Pública**, v. 29, p. 428-433, 1995.
2. AUTORE, G.; CAPASSO, F.; MASCOLO, N. Phenolphthalein stimulates the formation of histamine, 5-hydroxytryptamine and prostaglandin-like material by rat jejunum, ileum and colon. **Br. J. Pharmacol.**, v. 81, p. 347-348, 1984.
3. AVERY, M. E.; SNYDER, J. D. Oral therapy for acute diarrhea. The underused simple solution. **N. Engl. J. Med.**, v. 323, p. 891-894, 1990.
4. BANNER, S. E.; SMITH, M. I.; BYWATER, D.; GASTER, L. M.; SANGER, G. J. Increased defaecation caused by 5-HT₄ receptor activation in the mouse. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 308, p. 181-186, 1996.
5. BERN, C.; MARTINES, J.; DE ZOYSA, I.; GLASS, R. I. The magnitude of the global problem of diarrhoeal disease: a ten-year update. **Bull. World Health Organ.**, v. 70, 6, p. 705-714, 1992.
6. BETTOLO, R. M., SCARPATI, M. L. Alkaloids of *Croton draconoides*. **Phytochemistry**, v. 18, p. 520-520, 1979.
7. BEUBLER, E.; HORINA, G. 5-HT₂ and 5-HT₃ receptor subtypes mediate cholera toxin-induced intestinal fluid secretion in the rat. **Gastroenterology**, v. 99, p. 83-89, 1990.

8. BEUBLER, E.; SCHIRGI-DEGEN, A. Nitric oxide counteracts 5-hydroxytryptamine- and cholera toxin-induced fluid secretion and enhances the effect of oral rehydration solution. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 326, n. 2-3, p. 223-228, 1997.
9. BLACK, R. E. Persistent diarrhea in children of developing countries. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 12, p. 751-761, 1993.
10. BOECHXSTAENS, G. E.; PELCKMANS, P. A.; HERMAN, A. G.; VAN MAERCKE, Y. M. Involvement of nitric oxide in the inhibitory innervation of the human isolated colon. **Gastroenterology**, v. 104, p. 690-697, 1993.
11. BOUCHAUD, O. Diarrhea in immune deficiency status. **Rev. Prat.**, v. 46, n. 2, p. 206-212, 1996.
12. BOURIN, M.; HASCOET, M.; DEGUIRAL, P. 5-HT induced diarrhea as a carcinoid syndrome model in mice? **Fundam. Clin. Pharmacol.**, v. 10, n. 5, p. 450-457, 1996.
13. BRASITUS, T. A.; FIELD, M.; KIMBERG, V. Intestinal mucosal cyclic GMP: Regulation and relation to ion transport. **Am. J. Physiol.**, v. 231, p. G275-G282, 1976.
14. CACERES, A.; CANO, O.; SAMAYOA, B.; AGUILAR, L. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. 1. Screening of 84 plants against enterobacteria. **J. Ethnopharmacol.**, v. 30, n. 1, p. 55-73, 1990.

15. CAI, Y.; CHEN, Z. P.; PHILLIPSON, J. D. Clerodane diterpenoids from *Croton lechleri*. **Phytochemistry**, v. 34, n. 1, p. 265-268, 1993a.
16. CAI, Y.; CHEN, Z. P.; PHILLIPSON, J. D. Diterpenes from *Croton lechleri*. **Phytochemistry**, v. 32, n. 3, p. 755-760, 1993b.
17. CAI, Y.; EVANS, F. J.; ROBERTS, M. F.; PHILLIPSON, J. D.; ZENK, M. H.; GLEBA, Y. Y. Polyphenolic compounds from *Croton lechleri*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 6, p. 2033-2040, 1991.
18. CALIGNANO, A.; WHITTLE, B. J. R.; DI ROSA, M.; MONCADA, S. Involvement of endogenous nitric oxide in the regulation of rat intestinal motility *in vivo*. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 229, p. 273-276, 1992.
19. CAPASSO, A.; PINTO, A.; MASCOLO, N.; AUTORE, G.; CAPASSO, F. Reduction of agonist-induced contractions of guinea-pig isolated ileum by flavonoids. **Phytother. Res.**, v. 5, p. 85-87, 1991.
20. CAPASSO, F.; IZZO, A. A.; MASCOLO, N.; AUTORE, G.; DI CARLO, G. Effect of senna is not mediated by platelet-activating factor. **Pharmacol.**, v. 47, p. 58-63, 1993.
21. CAPASSO, F.; MASCOLO, N.; AUTORE, G. Laxatives and the production of autocooids by rat colon. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 38, p. 627-629, 1986.
22. CAPASSO, F.; PINTO, A.; MASCOLO, N.; AUTORE, G.; FRANCO, M. P. Effect of flavonoids on PGE₂- and LTB₄-induced contractions on the guinea-pig isolated ileum. **Pharm. Res. Commun.**, v. 20, p. 201-202, 1988.

23. CAPAZZO, F.; TAVARES, I. A.; TSANG, R.; BENNET, A. The role of calcium on eicosanoid production induced by ricinoleic acid or the calcium ionophore A23187. **Prostaglandins**, v. 30, p. 119-124, 1985.
24. CHAGNON, A. Travelers' diarrhea. **Rev. Prat.**, v. 46, n. 2, p. 189-195, 1996.
25. CHASSANY, O.; MICHAUX, A.; BERGMANN, J. F. Drug-induced diarrhoea. **Drug Saf.**, v. 22, n. 1, p. 53-72, 2000.
26. CHAVES, M. C.; SANTOS, F. A.; MENEZES, A. M. S.; RAO, V. S. N. Experimental evaluation of *Myracrodruon urundeuva* bark extract for antidiarrhoeal activity. **Phytother. Res.**, v. 12, p. 549-552, 1998.
27. CHEN, Z. P.; CAI, Y.; PHILLIPSON, J. D. Studies on the anti-tumor, anti-bacterial, and wound-healing properties of Dragon's Blood. **Planta Med.**, v. 60, p. 541-545, 1994.
28. CLARKE, L. L.; GRUBB, B. R.; GABRIEL, S. E.; SMITHIES, O.; KOLLER, B. H.; BOUCHER, R. C. Defective epithelial chloride transport in a gene targeted mouse model of cystic fibrosis. **Science**, v. 257, p. 1125-1128, 1992.
29. CRAVEIRO, A.; SILVEIRA, E. R. 2 cleistanthane type diterpenes from *Croton sonderianus*. **Phytochemistry**, v. 21, n. 10, p. 2571-2574, 1982.
30. CRAVEIRO, A.; SILVEIRA, E. R.; BRAZ FILHO, R.; MASCARENHAS, I. P. Sonderianin, a furanoid diterpene from *Croton sonderianus*. **Phytochemistry**, v. 20, n. 4, p. 852-854, 1981.

31. CROCI, T.; LANDI, M.; EMONDS ALT, X.; LE FUR, G.; MAFFRAND, J. P.; MANARA, L. Role of tachykinins in castor oil diarrhoea in rats. **Br. J. Pharmacol.**, v. 121, n. 3, p. 375-380, 1997.
32. CRUZ, G. L. **Dicionário das plantas úteis do Brasil**. 5. ed. Rio de Janeiro: Civilização Brasileira, 1982. p. 70-72.
33. DHAWAN, P. S.; DESAI, H. G. Prevention of gastrointestinal diseases. **Natl. Med. J. India**, v. 9, n. 2, p. 72-75, 1996.
34. DI CARLO, G.; AUTORE, G.; IZZO, A. A.; MAIOLINO, P.; MASCOLO, N.; VIOLA, P.; DIURNO, M. V.; CAPASSO, F. Inhibition of intestinal motility and secretion by flavonoids in mice and rats: structure-activity relationships. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 45, n. 12, p. 1054-1059, 1993.
35. FANNING, M. J.; MACANDER, P.; DRZEWIECKI, G.; MIDDLETON, E. Quercetin inhibits anaphylactic contraction of guinea-pig ileum smooth muscle. **Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.**, v. 71, n. 4, p. 371-373, 1983.
36. FARIAS, R. A. F.; NETO, M. F. O.; VIANA, G. S. B.; RAO, V. S. N. Effects of *Croton cajucara* extract on serum lipids of rats fed a high fat diet. **Phytother. Res.**, v. 10, p. 697-699, 1996.
37. FARNSWORTH, N. R.; AKERELE, O.; BINGEL, A. S.; SOEJARTO, D. D.; GUO, Z. Medicinal plants in therapy. **Bull. World Health Organ.**, v. 63, n. 6, p. 965-981, 1985.

38. FARNSWORTH, N. R.; BLOMSTER, R. N.; MESSMER, W. M.; KING, J. C.; PERSINOS, G. J.; WILKES, J. D. A phytochemical and biological review of the genus *Croton*. **Lloydia**, v. 32, n. 1, p. 1-28, 1969.
39. FARNSWORTH, N. R.; SOEJARTO, D. D. Global Importance of Medicinal Plants. In: AKERELE, O.; HEYWOOD, V.; SYNGE, H. (Eds.). **Conversation of Medicinal Plants**. 25th ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1991.
40. FARTHING, M. J. Diarrhoea: a significant worldwide problem. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 14, n. 1, p. 65-69, 2000.
41. FIELD, M. Intestinal secretion: effect of cyclic AMP and its role in cholera. **N. Engl. J. Med.**, v. 284, n. 20, p. 1137-1144, 1971.
42. FIELD, M.; SEMRAD, C. E. Toxigenic diarrheas, congenital transport. **Ann. Rev. Physiol.**, v. 55, p. 631-655, 1993.
43. GABRIEL, S. E.; BRIGMAN, K. N.; KOLLER, B. H.; BOUCHER, R. C.; STUTTS, M. J. Cystic fibrosis heterozygote resistance to cholera toxin in cystic fibrosis mouse model. **Science**, v. 266, p. 107-109, 1994.
44. GABRIEL, S. E.; DAVENPORT, S. E.; STEAGALL, R. J.; VIMAL, V., CARLSON, T.; ROZHON, E. J. A novel plant-derived inhibitor of cAMP-mediated fluid and chloride secretion. **Am. J. Physiol.**, v. 279, p. G58-G63, 1999.
45. GAGINELLA, T. S.; BASS, P. Laxatives: an update on mechanism of action. **Life Sci.**, v. 23, p. 1001-1010, 1978.

46. GAGINELLA, T. S.; CHADWICK, V. S.; DEBONGNIE, J. C.; LEWIS, J. C.; PHILLIPS, S. F. Perfusion of rabbit colon with ricinoleic acid: Dose-related mucosal injury fluid secretion and increased permeability. **Gastroenterology**, v. 73, p. 95-101, 1977.
47. GAGINELLA, T. S.; MASCOLO, N.; IZZO, A. A.; AUTORE, G.; CAPASSO, F. Nitric oxide as a mediator of bisacodyl and phenolphthalein laxative action: induction of nitric oxide synthase. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 270, p. 1239-1245, 1994.
48. GERHARDT, C. C.; HEERIKHUIZEN, H. V. Functional characteristics of heterologously expressed 5-HT receptors. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 334, p. 1-23, 1997.
49. GOLDSMITH, R. S. Medicamentos antiprotozoários. In: KATZUNG, B. G. **Farmacologia Básica e Clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. 755 p. cap. 54, p. 547-565.
50. GONZÁLEZ, E. S.; CALVO, L. E. R.; ARBELO, T. F. Persistent diarrhea. **GEN**, v. 49, n. 1, p. 74-81, 1995.
51. GOODMAN, L.; SEGRETI, J. Infectious Diarrhea. **Dis. Mon.**, v. 45, n. 7, p. 268-299, 1999.
52. GRIDER, J. R.; MURTHY, K. S.; JIN, J. G.; MAKHLOUF, G. M. Stimulation of nitric oxide from muscle cells by VIP: Prejunctional enhancement of VIP release. **Am. J. Physiol.**, v. 262, p. G774-G778, 1992.

53. GUERRANT, R. L.; KIRCHHOFF, L. V.; SHIELDS, D. S.; NATIONS, M. K.; LESLIE, J.; DE SOUZA, M. A.; ARAUJO, J. G.; CORREIA, L. L.; SAUER, K. T.; MCCLELLAND, K. E. Prospective study of diarrhoeal illnesses in northeastern Brazil: patterns of disease, nutritional impact, etiologies, and risk factors. **J. Infect. Dis.**, v. 148, n. 6, p. 986-997, 1983.
54. GUERRANT, R. L.; SCHORLING, J. B.; MCAULIFFE, J. F.; DE SOUZA, M. A. Diarrhea as a cause and an effect of malnutrition: diarrhea prevents catch-up growth and malnutrition increases diarrhea frequency and duration. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 47, n. 1, pt 2, p. 28-35, 1992.
55. GURGEL, L. A.; SILVA, R. M.; SANTOS, F. A.; MARTINS, D. T. O.; MATTOS, P. O.; RAO, V. S. N. Studies on the antidiarrhoeal effect of Dragon's Blood from *Croton urucurana*. **Phytother. Res.**, v. 14, p. 1-4, 2000.
56. HANSEN, M. B.; SKADHAUGE, E. Ketanserin and granisetron reduce cholera toxin-induced hypersecretion in pig jejunum. **Scand. J. Gastroenterol.**, v. 29, n. 10, p. 908-915, 1994.
57. HARTWELL, J. L. Plants used against cancer. A survey. **Lloydia**. v. 32, p. 153-205, 1969.
58. HERMANN, K. Flavonols and flavones in food plants: a review. **J. Fd. Technol.**, v. 11, p. 433-448, 1976.
59. HOLODNIY, M. SP-303: A new treatment for AIDS-associated diarrhea. In: WORLD AIDS CONFERENCE GENEVA, 12., 1998, Geneva. **Resumos...**

Geneva, 1998. Disponível em: <<http://www.shamanbotanicals.com>>. Acesso em: 22 ago. 1999.

60. ITOKAWA, H.; ICHIHARA, Y.; MOCHIZUKI, M.; ENOMORI, T.; MORITA, H.; SHIROTA, O.; INAMATSU, M.; TAKEYA, K. A cytotoxic substance from Sangre de Grado. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 39, n. 4, p. 1041-1042, 1991.
61. IZZO, A. A.; GAGINELLA, T. S.; MASCOLO, N.; BORRELLI, F.; CAPASSO, F. N^G-Nitro-L-arginine methyl ester reduces snna- and cascara-induced diarrhoea and fluid secretion in the rat. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 301, p. 137-142, 1996.
62. IZZO, A. A.; GAGINELLA, T. S.; MASCOLO, N.; CAPASSO, F. Nitric oxide as a mediator of the laxative action of magnesium sulphate. **Br. J. Pharmacol.**, v. 113, p. 228-232, 1994.
63. IZZO, A. A.; GAGINELLA, T. S.; MASCOLO, N.; CAPASSO, F. Recent findings on the mode of laxatives: the role of platelet activating factor and nitric oxide. **TIPS**, v. 19, p. 403-405, 1998.
64. IZZO, A. A. MASCOLO, N.; VIOLA, P.; CAPASSO, F. Inhibitors of nitric oxide synthetase enhance rat ileum cantractions induced by ricinoleic acid *in vitro*. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 243, p. 87-90, 1993.
65. IZZO, A. A.; NICOLETTI, M.; GIANNATTASIO, B.; CAPASSO, F. Antidiarrhoeal activity of *Terminalia sericea* Burch ex. DC extracts. In: CAPASSO, F.; MASCOLO, N. (Eds.). **Natural drugs and the digestive tract**. Roma: EMSI, 1992. p. 223-230.

66. JANOFF, E. N.; HAYAKAWA, H.; TAYLOR, D. N.; FASCHING, C. E.; KENNER, J. R.; JAIMES, E.; RAIJ, L. Nitric oxide production during *Vibrio cholerae* infection. **Am. J. Physiol.**, v. 273, n. 5, pt 1, p. G1160-G1167, 1997.
67. JIANG, M. M.; KIRCHGESSNER, M. D.; GERSHON, M. D.; SUPRENANT, A. Cholera toxin-sensitive neurons in guinea pig submucosal plexus. **Am. J. Physiol.**, v. 264, p. G86-G94, 1993.
68. KATSUKI, S.; ARNOLD, W. P.; MURAD, F. Effects of sodium nitroprusside, nitroglycerin, and sodium azide on levels of cyclic nucleotides and mechanical activity of various tissues. **J. Cyclic Nucleotide Res.**, v. 3, p. 239-247, 1977.
69. KEEF, K. D.; DU, C.; WARD, S. M.; MCGREGOR, B.; SANDERS, K. M. Enteric inhibitory neural regulation of human colonic circular muscle: Role of nitric oxide. **Gastroenterology**, v. 105, p. 1009-1016, 1993.
70. KELLY, C. P.; BECKER, S.; LINEVSKY, J. K.; JOSHI, M. A.; OKEANE, J. C.; DICKEY, B. F.; LAMONT, J. T.; POTHOUKAKIS, C. Neutrophil recruitment in *Clostridium difficile* toxin A enteritis in the rabbit. **J. Clin. Invest.**, v. 93, n. 3, p. 1257-1265, 1994.
71. KIMBERG, D. V.; FIELD, M.; JOHNSON, J.; HERDERSON, A.; GERSHON, E. Stimulation of intestinal mucosal adenyl cyclase by cholera enterotoxin and prostaglandins. **J. Clin. Invest.**, v. 50, p. 1218-1230, 1971.
72. KOSTKA, P.; JAN, E.; WATSON, E. G.; STEWARD, J. L.; DANIEL, E. E. Nitric oxide synthase in the autonomic nervous system of canine ileum. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 264, p. 234-239, 1993.

73. KUPCHAN, S. M.; UCHIDA, I.; BRANFMAN, A. R.; DAILEY, R. G.; FEI, B. Y. Antileukemic principles isolated from *Euphorbiaceae* plants. **Science**, v. 191, p. 571-572, 1976.
74. LANGREHR, J. M.; HOFFMAN, R. A.; LANCASTER, J. R.; SIMMONS, R. L. Nitric oxide-A new endogenous immunomodulator. **Transplantation**, v. 55, p. 1205-1212, 1993.
75. LIMA, A. A.; FANG, G.; SCHORLING, J. B.; DE ALBUQUERQUE, L.; MCAULIFFE, J. F.; MOTA, S.; LEITE, R.; GUERRANT, R. L. Persistent diarrhea in northeast Brazil: etiologies and interactions with malnutrition. **Acta. Paediatr. Suppl.**, v. 381, p. 39-44, 1992.
76. LIMA, A. A. M.; MOORE, S. R.; BARBOZA, M. S. J.; SOARES, A. M.; SCHLEUPNER, M. A.; NEWMAN, R. D.; SEARS, C. L.; NATARO, J. P.; FEDORKO, D. P.; WUHIB, T.; SCHORLING, J. B.; GUERRANT, R. L. Persistent diarrhea signals a critical period of increased diarrhea burdens and nutritional shortfalls: a prospective cohort study among children in Northeastern Brazil. **J. Infect. Dis.**, v. 181, p. 1643-1651, 2000.
77. MACNAUGHTON, W. K. Nitric oxide-donating compounds stimulate electrolyte transport in the guinea pig intestine *in vitro*. **Life Sci.**, v. 53, p. 585-593, 1993.
78. MACNAUGHTON, W. K.; CALARCO, A.; KRANTIS, A. Nitric oxide (NO) donating compounds stimulate electrolyte transport in the guinea pig intestine. **Gastroenterology**, v. 102, p. A223, 1992.

79. MAHALANABIS, D. Current status of oral rehydration as a strategy for the control of diarrhoeal diseases. **Indian J. Med. Res.**, v. 104, p. 115-124, 1996.
80. MAILMAN, D. Differential effects of lumenal L-arginine and N^G -nitro L-arginine on the blood flow and water fluxes in rat ileum. **Br. J. Pharmacol.**, v. 112, p. 304-310, 1994.
81. MANDELL, G. L.; DOUGLAS, R. G.; BENNETT, J. E. Principles and practice of infectious diseases. 1. ed. Londres: Churchill Livingstone Inc., 1997. 174 p. cap. 2, p. 52-53.
82. MARTINEZ, C. A.; BARUA, D.; MERSON, M. H. Control of diarrhoeal diseases. **World Health Stat. Q.**, v. 41, p. 74-81, 1988.
83. MASCOLO, N.; IZZO, A. A.; AUTORE, G.; BARBATO, F.; CAPASSO, F. Nitric oxide and castor oil-induced diarrhoea. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 268, p. 291-295, 1994.
84. MASCOLO, N.; IZZO, A. A.; BARBATO, F.; CAPASSO, F. Inhibitors of nitric oxide synthetase prevent castor oil-induced diarrhoea in rat. **Br. J. Pharmacol.**, v. 108, p. 861-864, 1993.
85. MATHAN, V. I. Tropical spru in southern India. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 82, p. 10-14, 1988.
86. MATHAN, V. I. Diarrhoeal diseases. **Br. Med. Bull.**, v. 54, p. 407-419, 1998.
87. MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. Fortaleza: Edições UFC, 1988. p. 35-57.

88. McGEE, D.W.; ELSON, C.O.; McGHEE, J.R. Enhancing effect of cholera toxin on interleucine-6 secretion by IEC-6 intestinal epithelial cells: mode of action and augmenting effect of inflammatory cytokines. **Infect. Immun.**, v. 61, p. 4637-4644, 1993.
89. MELI, R.; AUTORE, G.; DI CARLO, G.; CAPASSO, F., Inhibitory action of quercetin on intestinal transit in mice. **Phytother. Res.**, v. 4, p. 201-201, 1990.
90. MENEZES, A. M. S.; RAO, V. S. N., Effect of Astronium urundeuva (aroeira) on gastrointestinal transit in mice. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 21, n. 3, p. 531-533, 1988.
91. MENEZES, A. M. S.; VIANA, G. S. B.; VIETLA., S. N. R.; CORRÊA, R. A.; FEIJÓ, S. G. F. Estudo farmacológico. In: VIANA., G. S. B.; MATOS, F. J. A.; BANDEIRA, M. A. M.; RAO, V. S. N. **Aroeira do sertão (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.)**. Fortaleza: UFC, 1994. 187 p. cap. 4, p. 83-174.
92. MIDDLETON, E.; DRZEWIECKI, G. Flavonoid inhibition of human basophil histamine release stimulated by various agents. **Biochem. Pharmacol.**, v. 33, p. 3333-3334, 1984.
93. MILLER, L. C.; TANTER, M. L. Estimation of the ED₅₀ and error by means of logarithmic probit graph paper. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 57, p. 261-264, 1944.
94. MILLER, M. J. S.; MACNAUGHTON, W. K.; ZHANG, X. J.; THOMPSON, J. H.; CHARBONNET, R. M.; BOBROWSKI, P.; LAO, J.; TRENTACOSTI, A. M.; SANDOVAL, M. Treatment of gastric ulcers and diarrhea with the Amazonian

herbal medicine Sangre de Grado. **Am. J. Physiol.**, v. 279, p. G192-G200, 2000.

95. MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, v. 43, p. 109-142, 1991.
96. NICHOLS, K.; STAINES, W.; KRANTIS, A. Nitric oxide synthase distribution in the rat intestine: A histochemical analysis. **Gastroenterology**, v. 105, p. 1651-1661, 1993.
97. NILSON, O.; CASSUTO, J.; LARSSON, P.A.; JODAL, M.; LIDBERG, P.; AHLMAN, H.; DAHLSTRÖM, A.; LUNDGREEN, O. 5-Hydroxytryptamine and cholera secretion: a histochemical and physiological study in cats. **Gut**, v. 24, p. 542-548, 1983.
98. OKHUYSEN, P. C.; DUPONT, H. L.; ERICSSON, C. D.; MARANI, S.; MARTINEZ SANDOVAL, F. G.; OLESEN, M. A.; RAVELI, G. P. Zaldaride maleate (a new calmodulin antagonist) versus loperamide in the treatment of traveler's diarrhea: randomized, placebo controlled-trial. **Clin. Infect. Dis.**, v. 21, n. 2, p. 341-344, 1995.
99. OKUDA, T.; YOSHIDA, T.; HATANO, T. New methods of analyzing tannins. **J. Nat. Prod.**, v. 52, p. 1-31, 1989.
100. ORLANDI-MATTOS, P. E.; LAPA, F. R.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B.; MARTINS, D. T. O. Avaliação da atividade antiinflamatória do látex do *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae). In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 16., 2000, Recife. **Livro de Resumos**. Recife, 2000. p. 211.

101. PALMER, R. M. J.; ASHTON, D. S.; MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature**, v. 333, p. 664-666, 1988.
102. PERDUE, G. P.; BLOMSTER, R. N.; BLAKE, D. A.; FARNSWORTH, N. R. South American plants II: taspine isolation and anti-inflammatory activity. **J. Pharm. Sci.**, v. 68, p. 124-126, 1979.
103. PEREGRIN, A. T.; AHLMAN, H.; JODAL, M.; LUNDGREN, O. Involvement of serotonin and calcium channels in the intestinal fluid secretion evoked by bile salt and cholera toxin. **Br. J. Pharmacol.**, v. 127, n. 4, p. 887-894, 1999.
104. PEREGRIN, A. T.; SVENSSON, M.; JODAL, M.; LUNDGREN, O. Calcium channels and intestinal fluid secretion: an experimental study *in vivo* in rats. **Acta. Physiol. Scand.**, v. 160, n. 4, p. 371-378, 1997.
105. PERES, M. T. L. P.; DELLE MONACHE, F.; CRUZ, A. B.; PIZZOLATTI, M. G.; YUNES, R. A. Chemical composition and antimicrobial activity *Croton urucurana* Baillon. (Euphorbiaceae). **J. Ethnopharmacol.**, v. 56, p. 223-226, 1997.
106. PERES, M. T. L. P.; DELLE MONACHE, F.; PIZZOLATTI, M. G.; SANTOS, A. R. S.; BEIRITH, A.; CALIXTO, J. B.; YUNES, R. A. Analgesic compounds of *Croton urucurana* Baillon. Pharmacological criteria used in their isolation. **Phytother. Res.**, v. 12, p. 209-211, 1998.
107. PETERSON, J. W.; CANTU, J.; DUNCAN, S.; CHOPRA, A. K. Molecular mediators formed in the small intestine in response to cholera toxin. **J. Diarrhoeal Dis. Res.**, v. 11, n. 4, p. 227-234, 1993.

108. PHILIPSON, J. D. A matter of some sensitivity. **Phytochemistry**, v. 38, n. 6, p. 1319-1343, 1995.
109. PIETERS, L. A. C.; BERGHE, D. A. V.; VLIETINCK, A. J. A dihydrobenzofuran lignan from *Croton erythrochilus*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 1, p. 348-349, 1990.
110. PIETERS, L.; DE BRUYNE, T.; CLAEYS, M.; VLIETINCK, A. Isolation of a dihydrobenzofuran lignan from South American Dragon's Blood (*Croton* spp.) as an inhibitor of cell proliferation. **J. Nat. Prod.**, v. 56, n. 6, p. 899-906, 1993.
111. PIETERS, L.; DE BRUYNE, T.; VAN POEL, B.; VINGERHOETS TOTTE, J.; VANDEN BERGHE, D.; VLIETINCK, A. *In vivo* wound healing activity of Dragon's Blood (*Croton* spp.), a traditional South American drug, and its constituents. **Phytomedicine**. v. 2, p. 17-22, 1995.
112. PINTO, A.; AUTORE, G.; MASCOLO, N.; SORRENTINO, R.; BIONDI, A.; IZZO, A. A.; CAPASSO, F. Time course of Paf formation by gastrointestinal tissue in rats after castor oil challenge. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 44, p. 224-226, 1992.
113. PINTO, A.; CALIGNANO, A.; MASCOLO, N.; AUTORE, G.; CAPASSO, F. Castor oil increases intestinal formation of platelet-activating factor and acid phosphatase release in the rat. **Br. J. Pharmacol.**, p. 873-874, 1989.
114. PORRAS-REYES, B. H.; LEWIS, W. H.; ROMAN, J.; SIMCHOWITZ, L.; MUSTOE, T. A. Enhancement of wound healing by the alkaloid taspine defining mechanism of action. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 203, p. 18-25, 1993.

115. POTHOUKAKIS, C. Pathogenesis of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea. **Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 8, n. 11, p. 1041-1047, 1996.
116. RABBANI, G. H.; GREENOUGH, I. I. I.; HOLMGREN, J.; KIRKWOOD, B. Controlled trial of chlorpromazine as antisecretory agent in patients with cholera hydrated intravenously. **Br. Med. J.**, v. 284, n. 6326, p. 1361-1364, 1982.
117. RACHMILEWITZ, D.; KARMELI, F.; OKON, E. Effects of Bisacodyl on cAMP and prostaglandin E₂ contents, (Na+K) ATPase, adenylyl cyclase, and phosphodiesterase activities of rat intestine. **Dig Dis. Sci.**, v. 25, p. 602-608, 1980.
118. RAJAN, D. P.; MATHAN, V. I. The prevalence of bacterial enteric pathogens in a healthy population in southern India. **J. Med. Microbiol.**, v. 22, p. 93-99, 1986.
119. RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. 692 p. cap. 19, p. 306-320.
120. RAO, R. K.; RIVIERE, P. J. M.; PASCAUD, X.; JUNIEN, J. L.; PORRECA, F. Tonic regulation of mouse ileal ion transport by nitric oxide. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 269, p. 626-631, 1994.
121. RAO, V. S. N.; SANTOS, F. A.; SOBREIRA, T. T.; SOUZA, M. F.; MELO, C. L.; SILVEIRA, E. R. Investigations on the gastroprotective and antidiarrhoeal properties of ternatin, a tetramethoxyflavone from *Egletes viscosa*. **Planta Med.**, v. 63, p. 146-149, 1997.

122. REES, D. D.; PALMER, R. M. J.; SCHULTZ, R.; HODSON, H. F.; MONCADA, S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase *in vivo* and *in vitro*. **Br. J. Pharmacol.**, v. 101, p. 746-752, 1990.
123. RICHARDSON, S. H.; KUHN, R. E. Studies on the genetic and cellular control of sensitivity to enterotoxins in the sealed adult mouse model. **Infect. Immun.**, v. 54, n. 2, p. 522-528, 1986.
124. ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S.; KUMAR, V. **Robbins patologia estrutural e funcional**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 1277 p.
125. ROCHA, M. F. G.; SOARES, A. M.; FLORES, C. A.; STEINER, T. S.; LYERLY, D. M.; GUERRANT, R. L.; RIBEIRO, R. A.; LIMA, A. A. M. Intestinal secretory factor release by macrophages stimulated with *Clostridium difficile* toxin A: role of interleukin 1-beta. **Infect. Immun.**, v. 66, n. 10, p. 4910-4916, 1998.
126. SANDERS, K. M.; WARD, S. M. Nitric oxide as a mediator of nonadrenergic noncholinergic neurotransmission. **Am. J. Physiol.**, v. 262, p. G379-G392, 1992.
127. SANGER, G. J.; YOSHIDA, M.; YAHYAH, M.; KITAZUMI, K. Increased defecation during stress or after 5-hydroxytryptophan: selective inhibition by the 5-HT₄ receptor antagonist, SB-207266. **Br. J. Pharmacol.**, v. 130, n. 3, p. 706-712, 2000.
128. SANSONETTI, P. J. Genetic and molecular basis of epithelial cell invasion by *Shigella* species. **Rev. Infect. Dis.**, v. 13, p. S285-S292, 1991.

129. SANTOS, A. R. S.; NIERO, R.; CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R. A.; PIZZOLATTI, G.; DELLE MONACHE, F.; CALIXTO, J. B. Antinociceptive properties of steroids isolated from *Phyllanthus corcovadensis* in mice. **Planta Med.**, v. 61, p. 329-332, 1995.
130. SAUNDERS, D. R.; SILLERY, J.; RACHMILEWITZ, D.; RUBIN, C. E.; TYTGAT, G. N. Effects of bisacodyl on the structure and function of rodent and human intestine. **Gastroenterology**, v. 72, p. 849-856, 1977.
131. SAUNDERS, D. R.; SILLERY, J.; SURAWICA, C.; TYTGAT, G. N. Effect of phenolphthalein on the function and structure of rodent and human intestine. **Dig. Dis. Sci.**, v. 23, p. 909-913, 1978.
132. SCHILLER, L. R. Review article: anti-diarrhoeal pharmacology and therapeutics. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, v. 9, n. 2, p. 87-106, 1995.
133. SCHIRGI-DEGEN, A.; BEUBLER, E. Significance of nitric oxide in the stimulation of intestinal fluid absorption in the rat jejunum *in vivo*. **Br. J. Pharmacol.**, v. 114, p. 13-18, 1995.
134. SCHIRGI-DEGEN, A.; BEUBLER, E. Involvement of K⁺ channel modulation in the proabsorptive effect of nitric oxide in the rat jejunum *in vivo*. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 316, p. 257-262, 1996.
135. SCHWARTZ, J. C. Racecadotril: a new approach to the treatment of diarrhoea. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 14, n. 1, p. 75-79, 2000.

136. SHOOK, J. E.; BURKS, T. F.; WASLEY, J. W.; NORMAN, J. A. Novel calmodulin antagonist CGS 9343B inhibits secretory diarrhea. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 251, p. 247-252, 1989.
137. SILBERSCHMIDT, G.; SCHICK, M. T.; STEFFEN, R.; KILPATRICK, M. E.; MURPHY, J. R.; OYOFO, B. A.; EL ETR, S.; GYURECH, D.; MOURAD, A. S.; MATHEWSON, J. T. Treatment of travellers' diarrhoea: zaldaride compared with loperamide and placebo. **Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 7, p. 871-875, 1995.
138. SNYDER, J.D.; MERSON, M.H. The magnitude of the global problem of acute diarrhoeal disease: a review of the active surveillance data. **Bull. World Health Organ.**, v. 60, n. 4, p. 605-613, 1982.
139. SOUZA BRITO, A. R.; SOUZA BRITO, A. A. Forty years of Brazilian medicinal plant research. **J. Ethnopharmacol.**, v. 39, p. 53-67, 1993.
140. STARK, M. E., BAUER, A. J.; SZURSZEWSKI, J. H. Effect of nitric oxide on circular muscle of the canine small intestine. **J. Physiol.**, v. 444, p. 743-761, 1991.
141. STARK, M. E.; BAUER, A. J.; SARR, M. G.; SZURSZEWSKI, J. H. Nitric oxide mediates inhibitory nerve input in human and canine jejunum. **Gastroenterology**, v. 104, p. 398-409, 1993.
142. TADANO, T., KISARA, K.; STEWART, J. J. A comparison of peripheral and central effects of clonidine on rat intestinal transit. **Res. Com. Chem. Pathol. Pharmacol.**, v. 78, n. 2, p. 161-179, 1992.

143. TEPPERMAN, B.; BROWN, J. F.; WHITTLE, B. J. R. Nitric oxide synthase induction and intestinal epithelial cell viability in rats. **Am. J. Physiol.**, v. 265, p. G214-G218, 1993.
144. TRIADAFILOPOULOS, G.; POTHOUKAKIS, C.; WEISS, R.; GIAMPAOLO, C.; LaMONT, J.T. Comparative study of *Clostridium difficile* toxin A and cholera toxin in rabbit ileum. Role of prostaglandins and leukotrienes. **Gastroenterology**, v. 97, p. 1186-1192, 1989.
145. TURVILL, J. L.; MOURAD, F. H.; FARTHING, M. J. G. Proabsorptive and prosecretory roles for nitric oxide in cholera toxin induced secretion. **Gut**, v. 44, n. 1, p. 33-39, 1999.
146. UBILLAS, R.; JOLAD, S. D.; BRUENING, R. C.; KERNAN, M. R.; KING, S. R.; SESIN, D. F.; BARRETT, M.; STODDART, C. A.; FLASTER, T.; KUO, J.; AYALA, F.; MEZA, E.; CASTAÑEL, M.; McMEEKIN, D.; ROZHON, E.; TEMPESTA, M. S.; BARNARD, D.; HUFFMAN, J.; SMEE, D.; SIDWELL, R.; SOIKE, K.; BRAZIER, A.; SAFRIN, S.; ORLANDO, R.; KENNY, P. T. M.; BEROVA, N.; NAKANISHI, K. SP-303, na antiviral oligomeric proanthocyanidin from the latex of *Croton lechleri* (Sangre de Drago). **Phytomedicine**, v. 1, p. 77-106, 1994.
147. VAISBERG, A. J.; MILLA, M.; PLANAS, M. D. C.; CORDOVA, J. L.; AGUSTI, E. R.; FERREYRA, R.; MUSTIGA, M. D. C.; CARLIN, L.; HAMMOND, G. B. Taspine is the cicatrizant principle in Sangre de Grado extracted from *Croton lechleri*. **Planta Med.**, v. 55, p. 140-143, 1989.

148. WARD, S. M.; DALZIEL, H. H.; BRADLEY, M. E.; BUXTON, I. L. O.; KEEF, K.; WESTFALL, D. P.; SANDERS, K. M. Involvement of cyclic GMP in non-adrenergic, non-cholinergic inhibitory neurotransmission in dog proximal colon. **Br. J. Pharmacol.**, v. 107, p. 1075-1082, 1992.
149. WILSON, K. T.; XIE, Y.; MUSCH, M. W.; CHANG, E. B. Sodium nitroprusside stimulates anion secretion and inhibits sodium chloride absorption in rat colon. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 266, p. 224-230, 1993.