

**Universidade Federal da Paraíba
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-graduação em Produtos
Naturais e Sintéticos Bioativos**

Joedna Cavalcante Pereira

**A esponja *Oceanapia* sp. apresenta efeito dual sobre a motilidade
gastrointestinal de roedores: ensaios *in vitro* e *in vivo***

**João Pessoa-PB
2016**

Joedna Cavalcante Pereira

A esponja *Oceanapia sp.* apresenta efeito dual sobre a motilidade gastrointestinal de roedores: ensaios *in vitro* e *in vivo*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de **Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos**. Área de Concentração: **Farmacologia**.

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana de Andrade Cavalcante

Coorientadora: Profa. Dra. Bagnólia Araújo da Silva

**João Pessoa-PB
2016**

Joedna Cavalcante Pereira

**A esponja *Oceanapia sp.* apresenta efeito dual sobre a motilidade
gastrointestinal de roedores: ensaios *in vitro* e *in vivo***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de **Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos**. Área de Concentração: **Farmacologia**.

Aprovada em ____/____/____

Banca Examinadora

Profa. Dra. Fabiana de Andrade Cavalcante
(Universidade Federal da Paraíba)
Orientadora

Profa. Dra. Bagnólia Araújo da Silva
(Universidade Federal da Paraíba)
Coorientadora

Prof. Dr. Joelmir Lucena Veiga da Silva
(Universidade Nove de Julho/São Paulo)
Examinador externo

Profa. Dra. Tatjana Keesen de Souza Lima
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinadora interna

Dedicat6rias

Aos meus amores, Irenice Cavalcante e Genivaldo Rodrigues. Por sempre serem meu alicerce e espelho. Por toda a dedicação e amor depositados em mim e pela confiança incondicional. Deus me deu de presente os melhores pais. É por vocês que tento ser melhor cada dia mais.

Às minhas irmãs, Kaliane Wilma e Rafaelle Cavalcante, e ao meu cunhado Josélio Joubert, que considero um verdadeiro irmão. Pela presença constante em minha vida, apesar da distância, por me fazerem sentir sempre muito amada e por quererem sempre o meu melhor.

À minha sobrinha Júlia Cavalcante Paulo. Por ser uma das melhores coisas na minha vida. Pela alegria de cada sorriso e por me fazer tão feliz.

À minha avó, Jalmira Candeia, pelo maior exemplo de lutas e vitórias e por me apoiar em cada decisão.

Ao meu namorado, amigo, companheiro, confidente, Italo Rossi. Por tornar momentos simples nos melhores, por caminhar ao meu lado, pelas palavras de carinho, por todo o empenho em me fazer feliz. A caminhada não seria tão agradável sem você.

A vocês dedico.

Agradecimientos

A gratidão é um dos sentimentos mais lindos e eu não poderia chegar ao fim dessa etapa mais grata, por ter carregado comigo pessoas queridas que me ajudaram de formas tão peculiares com o que cada um poderia oferecer em diferentes momentos, por isso agradeço:

A Deus, por me tornar capaz de dar sempre o passo adiante, colocando em meu caminho obstáculos para me fazer cada vez mais forte. Por ser tão maravilhoso na minha vida e por tornar possível a realização de tantos sonhos. Por me mostrar que o caminho certo nem sempre é o que planejo, mas é quem tem as melhores coisas guardadas para minha vida.

À minha orientadora, Fabiana de Andrade Cavalcante por toda paciência e dedicação, por ter aceito a minha orientação sem ao menos me conhecer. Por contribuir com a minha formação acadêmica e pelo amor que faz transparecer por tudo aquilo que faz e por me fazer querer sempre dar o melhor de mim para nunca desapontá-la.

À minha coorientadora, Bagnólia Araújo da Silva e minha eterna orientadora. Por ter me acolhido durante todo o tempo de Iniciação Científica (IC). Pelo exemplo de profissional e, com isso, me fazer amar ainda mais o que faço e ter certeza do caminho que tomei na vida. Por todas as conversas, risos e palavras de conforto, transmitindo ensinamentos valiosos e imprescindíveis à minha formação pessoal e profissional.

À Profa. Dra. Bárbara Viviana de Oliveira Santos pela gentileza em ceder o extrato objeto de estudo deste trabalho.

À Profa. Dra. Tatjana Keesen de Souza Lima e Prof. Dr. Joelmir Lucena Veiga da Silva por aceitarem participar desta importante etapa na minha formação e pelas contribuições a este trabalho, assim como à Profa Dra. Marianna Vieira Sobral e ao Prof. Dr. Robson Cavalcante Veras, por aceitar à suplência.

À Paula Benvindo, Renata Sampaio e Millena Medeiros, por todos os momentos de descontração dentro e fora do laboratório e os de lágrimas também. Por todas as conversas, risos e sorrisos compartilhados, por todas as palavras de incentivo e por toda ajuda sempre oferecida em qualquer momento. Levarei eternamente esses momentos comigo.

À Gislaine Alves, minha amiga onde quer que esteja. Agradeço simplesmente

por estar sempre perto, por saber que tenho sua presença e amizade onde quer que eu esteja. Torço muito pela sua felicidade e sei que esses laços nunca serão desfeitos.

À Sarah Rebeca, Giulyane Targino, Indyra Figueiredo, Filipe Rodolfo, Antônio Raphael e Giuliana Amanda, por serem os melhores ICs, pela ajuda incessante, principalmente, no fim dos experimentos, por nunca negarem ajuda, por me ensinarem bastante e por tornar o convívio diário sempre agradável.

À Maria da Conceição Correia, por toda ajuda que me foi dada nos últimos passos desse trabalho, tenha certeza que sua ajuda foi de grande valia e serei eternamente grata.

A todos os colegas e amigos que fazem ou fizeram parte do Laboratório de Farmacologia Funcional Prof. George Thomas do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPgPNSB) do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, entre eles: Alana Cristina Costa, Aline de Freitas, Ana Carolina de Carvalho, Ana Caroline de Lima, Antônio Raphael, Barbara Cavalcanti, Cibério Landim, Cybelle de Arruda, Elba Ferreira, Fabio Monteiro, Fernando Ramos, Filipe Rodolfo, Gislaine Alves, Giuliana Amanda, Giulyane Targino, Hannah Olga, Iara Leão, Italo Rossi, José Lucas, José Rabelo, Juliana Carreiro, Kimã Barbosa, Layanne Cabral, Luiz Henrique Agra, Luiz Henrique César, Maria Alice Miranda, Maria da Conceição Correia, Millena Medeiros, Paula Benvindo, Polyana Cristina, Rafael Travassos, Renata Sampaio, Sarah Rebeca, Tamyris Freires Ferreira e Thiago Melo, com vocês aprendi muito e levarei sempre comigo muita lição acadêmica e de vida. Muito obrigada pela ajuda, convivência e trocas de conhecimentos científicos.

A todos os Professores que fazem parte do PPgPNSB, em especial a: Eduardo Oliveira, Demétrius Araújo, Bagnólia Araújo, Fabiana Cavalcante e Tatjana Keesen, por mostrarem que uma Pós-graduação deve ser feita com pensamento crítico aguçado, por fazerem meus olhos brilharem a cada aula ministrada e por serem os espelhos que todos os discípulos querem seguir.

A todos os Professores do Curso de Graduação em Farmácia, em especial a: Adalberto Coelho, Alba Caiaffo, Arnaldo Medeiros, Bagnólia Araújo, Eduardo Oliveira, Elizete Ventura, Francisca Inês, João Vianney, Pablo Queiroz, Patrícia Simões, Robson Veras, Samuel Meira e Zélia Braz por deixarem sempre claro que ser

Professor não é apenas transmitir o conhecimento e sim extrair do aluno aquilo que ele tem de melhor.

Aos amigos que fiz na graduação em farmácia, a eterna “Turma Feliz, Farmácia 2013.1”, Juliana Constantino Monteiro, Lídia Lúcia Bezerra, Liliane de Queirós Souza, Maria da Conceição Correia Silva, Renata Rodrigues e Thaylan Martins de Souza, em especial a Lídia e a Juliana, pelas horas de boas conversas, pelo apoio incansável e por dividir comigo as alegrias e tristezas. Apesar da pouca convivência ultimamente, saber que as tenho por perto me dá muita força.

Aos melhores amigos que poderia ter: Alice Dal Piva, Alysson Neri, Amanda Cardoso, Camylla Vieira, Filipe Belmont, Guilherme Santana, Hery Diniz, Izabelly Guimarães, Jéssica Karoline Nascimento, João Henrique Madeiro, Maria Clotilde Sampaio, Maria Eduarda Sampaio, Peterson Filipe e Shymene Ferreira. Por tornarem infinita uma amizade de escola, não deixando que a amizade esfrie nunca, por me conhecer, entender e apoiar em todos os momentos, pelas palavras de conforto e pelos puxões de orelha, eu com certeza não seria a mesma sem a força de cada um.

A todos os colegas das turmas de mestrado do PPgPNSB, com quem convivi durante as disciplinas. Em especial, Maria da Conceição, Igor Sales, Raphaela Nascimento, Daniele de Figueiredo e Renan Braga.

A toda minha família, tias, tios, primos e primas que sempre torceram pela realização de mais essa etapa.

A toda família Martins, meus sogros e cunhados, Zilá Martins, Benedito Martins, Priscila Martins e Lucas Martins, que me acolhem e me tratam muito bem.

À Coordenação do PPgPNSB em nome do Prof. Dr. Josean Tavares pela competência pela qual coordena este Programa.

À Caroline Manguiera, secretária do PPgPNSB, pela paciência, disponibilidade, dedicação e eficiência com que conduz seu trabalho.

Ao José Crispim Duarte pela competência, disposição e auxílio técnico nos mais variados problemas no Laboratório e no Biotério.

Ao Luís Cordeiro e Adriano Cordeiro pela colaboração no Biotério e no Laboratório, por sua prestatividade e dedicação.

À Mônica Rodrigues por sua alegria, bom humor e por manter nosso ambiente

de trabalho/estudo sempre melhor para nossas tarefas diárias.

Ao Professor João Samuel Meira do Conselho Federal de Farmácia pelo apoio financeiro concedido para participação de diversos eventos acadêmicos.

À Universidade Federal da Paraíba, instituição responsável pela minha formação profissional.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa concedida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pelo suporte técnico-científico através do Portal Periódicos.

A todos que de maneira direta ou indireta contribuíram para a produção desta dissertação.

Muito obrigada,

Joedna Cavalcante Pereira

“Que meus olhos nunca deixem de ver o lado bom das pessoas, que minhas mãos estejam sempre prontas para levantar, não empurrar. Que meus pés levem o amor, que minha boca não seja usada para dizer palavras amargas e de derrota. Que meus ouvidos sejam pacientes para ouvir a dor do outro, que meu coração nunca fique duro, escuro. Que eu nunca desista de recomeçar. As tempestades vem, sempre, mas que além delas sempre venha uma fé bonita e a esperança de que as coisas se ajeitam.”

Drica Serra

(A menina e o violão)

Resumo

Os produtos naturais marinhos tem atraído a atenção de pesquisadores por ser uma fonte em potencial para o desenvolvimento de medicamentos. As esponjas do gênero *Oceanapia* possuem cerca de 100 espécies distribuídas em mares tropicais de todo mundo. Alguns estudos com produtos marinhos demonstram atividade em músculo liso, entretanto para *Oceanapia sp.* não há relatos. Assim, decidiu-se avaliar as atividades farmacológica e toxicológica do extrato etanólico obtido da esponja *Oceanapia sp.* (OC-EtOH). Para os ensaios *in vitro* (n = 5), os segmentos do íleo de cobaia eram suspensos em banhos de órgãos, onde as contrações isotônicas e isométricas eram registradas. Já para os ensaios *in vivo* (n = 6), os camundongos eram divididos em grupos: controle negativo (solução salina + Cremophor®, v.o.), controle positivo (atropina, v.o.) e OC-EtOH (várias doses, v.o.), onde eram investigados o efeito do extrato sobre o trânsito intestinal normal e induzido por óleo de rícino. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFPB (Protocolo nº 146/2015). Na triagem farmacológica preliminar, o OC-EtOH induziu uma contração dependente de concentração sobre o tônus basal de íleo de cobaia ($CE_{50} = 48,6 \pm 2,7 \mu\text{g/mL}$). Já sobre o componente tônico da contração induzida por KCl e por histamina em íleo de cobaia, o extrato apresentou uma contração transiente ($CE_{50} = 176,6 \pm 32,6$ e $73,5 \pm 6,9 \mu\text{g/mL}$, respectivamente), seguida de um relaxamento ($CE_{50} = 103,9 \pm 8,6$ e $90,1 \pm 9,2 \mu\text{g/mL}$, respectivamente), ambos de maneira dependente de concentração. Diferentemente, quando a contração era induzida por carbachol, o extrato apresentou apenas relaxamento dependente de concentração ($CE_{50} = 97,1 \pm 17,4 \mu\text{g/mL}$). Na investigação do mecanismo espasmogênico, observou-se que na presença de diferentes concentrações de atropina, antagonista muscarínico, as curvas concentrações-resposta cumulativas ao OC-EtOH não foram deslocadas. Já na presença de pirlamina, antagonista de receptores histaminérgicos (H_1), as curvas concentrações-resposta foram desviadas para a direita, de maneira não paralela, com redução na potência e na eficácia e abolição de seu efeito espasmogênico, sugerindo a participação dos H_1 no efeito espasmogênico do OC-EtOH. Semelhantemente, na presença de verapamil, bloqueador dos canais de cálcio dependentes de voltagem (Ca_v), as curvas concentrações-resposta cumulativas ao OC-EtOH foram desviadas para a direita, de maneira não paralela, com redução na potência e na eficácia contrátil do extrato, sugerindo que o mecanismo de ação espasmogênica do extrato também envolve a ativação dos Ca_v . Na avaliação do mecanismo espasmolítico, observou-se que na presença de pirlamina, o componente espasmogênico foi abolido e a potência espasmolítica do OC-EtOH sobre contração tônica induzida por KCl ($CE_{50} = 62,9 \pm 9,9 \mu\text{g/mL}$) foi potencializada. Como o passo comum da via de sinalização dos agentes contráteis utilizados são os Ca_v , investigou-se a participação destes no mecanismo de ação espasmolítica do OC-EtOH. As curvas controle cumulativas ao $CaCl_2$, na presença do extrato, foram desviadas para direita de forma não paralela e com redução do E_{max} . O OC-EtOH também relaxou o íleo pré-contraído com S(-)-Bay K 8644 ($CE_{50} = 166,9 \pm 17,8 \mu\text{g/mL}$), um agonista dos Ca_v-1 , demonstrando que o subtipo de Ca_v envolvido é o Ca_v1 . Como a potência relaxante do OC-EtOH foi maior quando o órgão foi pré-contraído com KCl + pirlamina do que pelo S(-)-Bay K 8644 é sugestivo de que outros mecanismos estão envolvidos no efeito espasmolítico do OC-EtOH. No ensaio de toxicidade aguda, o OC-EtOH (2000 mg/kg, v.o.) não induziu sinais de toxicidade em camundongos fêmeas (n = 6) nas condições experimentais avaliadas e a dose de uma droga que produz 50% de seu efeito máximo é igual ou superior a 5000 mg/kg de acordo com o guia nº 423 da OECD. Como alguns compostos com atividade dual (espasmolítica e espasmogênica) em músculo liso são utilizados no tratamento da diarreia e constipação, decidiu-se investigar se o OC-EtOH apresentaria efeito sobre o trânsito intestinal de camundongos. Pode-se observar que o extrato aumentou o trânsito intestinal normal ($DE_{50} = 477,6 \pm 14,8 \text{ mg/kg}$) e inibiu o trânsito induzido por óleo de rícino ($DE_{50} = 93,30 \pm 7,2 \text{ mg/kg}$). Assim, conclui-se que o OC-EtOH apresenta efeito dual em íleo de cobaia promovendo contração via ativação dos receptores H_1 e dos Ca_v e relaxamento pelo bloqueio dos Ca_v , além do efeito sobre o trânsito intestinal em camundongos, mostram uma potencial utilização medicinal da esponja *Oceanapia sp.* em doenças intestinais como a diarreia e/ou constipação.

Palavras-chave: *Oceanapia sp.*, esponja, espasmogênico, espasmolítico, trânsito intestinal.

Abstract

Marine natural products have attracted the attention of researchers due to be a potential source to new medicines. *Oceanapia* sponges present around 100 species distributed on tropical worldwide seas. Some studies of marine products have shown activity in smooth muscle, however for *Oceanapia* sp. there is no report. So, we decided to assess the pharmacologic and toxicological activities of the ethanolic extract of *Oceanapia* sp. sponge (OC-EtOH). To *in vitro* assays (n = 5), guinea pig ileum segments were suspended on organ baths and isometric and isotonic contractions registered. In the *in vivo* assays (n = 6), mice were divided in groups: negative control (saline + Cremophor®, v.o.), positive control (atropine, v.o.) and OC-EtOH (several doses, v.o.) where its were investigated the effect of the extract on normal and induced intestinal transit by castor oil. All the experimental protocols were approved by Ethical Committee in Animal Use of UFPB (Protocol 146/2015). In pharmacological screening, OC-EtOH induced a concentration dependent contraction on basal tonus on guinea pig ileum ($EC_{50} = 48.6 \pm 2.7 \mu\text{g/mL}$). In tonic component of the contraction induced by KCl and histamine on guinea pig ileum, the extract presented a transient contraction ($EC_{50} = 176.6 \pm 32.6$ and $73.5 \pm 6.9 \mu\text{g/mL}$, respectively), also followed by a concentration-dependent relaxation ($EC_{50} = 103.9 \pm 8.6$ and $90.1 \pm 9.2 \mu\text{g/mL}$, respectively). Differently, when CCh was used as contractile agent, OC-EtOH presented only a concentration-dependent relaxation ($EC_{50} = 97.1 \pm 17.4 \mu\text{g/mL}$). In the investigation of spasmogenic mechanism, we observed that in the presence of different concentrations of atropine, a muscarinic antagonist, the cumulative curves to OC-EtOH were not shifted. However, in the presence of pyrilamine, a receptor histaminergic antagonist (H_1), the cumulative curves to OC-EtOH were shifted to the right, in a non-parallel manner with reduction on efficacy and potency and abolishment of spasmogenic effect, suggesting the involvement of H_1 on spasmogenic effect of OC-EtOH. Similar result was obtained when used the verapamil, a voltage gated calcium channels blocker (Ca_v), that was added in different concentrations and the cumulative curves to OC-EtOH were shifted to the right, in a non-parallel manner with reduction on efficacy and potency spasmogenic, suggesting the mechanism of action of the extract also involves the Ca_v activation. In the investigation of spasmolytic mechanism, in pyrilamine presence, the spasmogenic component was abolished and the OC-EtOH relaxant potency was potentiated on the KCl-induced tonic contraction ($EC_{50} = 62.9 \pm 9.9 \mu\text{g/mL}$). As the common pathway in the contractile agents used is the Ca_v , it has assessed these channels participation. The control curves to $CaCl_2$ were shifted to the right, in a presence of extract, in a non-parallel manner with E_{max} reduction. Besides to relax the ileum pre-contracted by S-(-)-Bay K 8644 ($EC_{50} = 166.9 \pm 17.8 \mu\text{g/mL}$), a Ca_v -1 agonist, showing that this channel subtype are involved. As the OC-EtOH relaxant potency was greater when the organ was pre-contracted with KCl + pyrilamine than S-(-)-Bay K 8644 was the contractile agent, it is suggestive that other mechanism are probably involved. In acute toxicity assay, OC-EtOH (2000 mg/kg, p.o.) did not induce toxicity signs in female mice (n = 6) in the experimental conditions and the 50% lethal dose is equal or superior to 5000 mg/kg according to OECD 423 guide. Since some compounds with dual action (spasmolytic and spasmogenic) on smooth muscle are indicated to diarrhea and constipation treatment, it was investigate a possible OC-EtOH presents antidiarrheal action on mice. The extract increased the intestinal normal transit ($ED_{50} = 477.6 \pm 14.8 \text{ mg/kg}$) and reduced the intestinal transit in the ricin oil induced diarrhea ($ED_{50} = 93.30 \pm 7.2 \text{ mg/kg}$). Thus, OC-EtOH presented a dual effect on guinea pig ileum by H_1 and Ca_v activation and relaxation via Ca_v blockade, besides intestinal transit effect in mice that occurs by modification in the intestinal motility, indicating a potential medicinal usage of the sponje *Oceanapia* sp. on intestinal conditions as diarrhea and/or constipation.

Keywords: *Oceanapia* sp., sponge, spasmogenic, spasmolytic, intestinal transit.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fotos das espécies <i>Oceanapia bartschi</i> (A), <i>O. nodosa</i> (B) e <i>O. petrosia</i> (C).....	32
Figura 2 – Metabólitos secundários isolados do gênero <i>Oceanapia</i> : Oceanapamina (A), Petrosamina B (B) e Ácido acetilênico (C).....	33
Figura 3 – Esquema do mecanismo fármaco-mecânico da contração no músculo liso via $G_{q/11}$ PLC β_1	36
Figura 4 – Acoplamento eletromecânico da contração muscular lisa pelo aumento da concentração extracelular de K^+	38
Figura 5 – Esquema do mecanismo fármaco-mecânico do relaxamento no músculo liso pela ativação da via G_s -AC-PKA e NO-sGC-PKG	40
Figura 6 – Esquema do mecanismo de ação do óleo de rícino.....	45
Figura 7 – Registro representativo do efeito contrátil (A) e cumulativo (B) do OC-EtOH sobre o tônus basal em íleo isolado de cobaia.....	63
Figura 8 – Registros representativos do efeito dual do OC-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por 40 mM de KCl (A), por 10^{-6} M de histamina (B) e por 10^{-5} M de CCh (C) em íleo isolado de cobaia.....	66
Figura 9 – Registros representativos das curvas concentrações-resposta cumulativas ao CCh (A) e ao OC-EtOH (B) na ausência e na presença de 3×10^{-8} M de atropina em íleo isolado de cobaia.....	70
Figura 10 – Registros representativos das curvas concentrações-resposta cumulativas à histamina (A) e ao OC-EtOH (B) na ausência e na presença de 3×10^{-7} M de pirilamina em íleo isolado de cobaia.....	74
Figura 11 – Registros representativos do efeito espasmolítico de 10^{-6} M de verapamil sobre a contração tônica induzida por OC-EtOH (A) e das curvas concentrações-resposta cumulativas ao OC-EtOH na ausência e na presença de 10^{-6} M de verapamil (B) em íleo isolado de cobaia.....	78
Figura 12 – Registros representativos do efeito espasmolítico do OC-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por 40 mM de KCl na ausência (A) e na presença de pirilamina (B) em íleo isolado de cobaia.....	81
Figura 13 – Registros representativos das curvas concentrações-resposta cumulativas ao $CaCl_2$ em meio despolarizante nominalmente sem Ca^{2+} na ausência e na presença de 3×10^{-6} M de verapamil (A) ou de 729 μ g/mL do OC-EtOH (B) em íleo isolado de cobaia.....	84
Figura 14 – Registros representativos do efeito espasmolítico de verapamil (A), do OC-EtOH (B) sobre a contração induzida por 3×10^{-7} M de S-(-)-Bay K8644 parcialmente despolarizado com 15 mM de KCl em íleo isolado de cobaia.....	88

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** – Curva concentração-resposta cumulativa do OC-EtOH (●) sobre o tônus basal em íleo isolado de cobaia.....64
- Gráfico 2** – Efeito contrátil do OC-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por 40 mM de KCl (A) e por 10^{-6} M de histamina (B) em íleo isolado de cobaia.....67
- Gráfico 3** – Efeito do OC-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por 40 mM de KCl (✕), por 10^{-6} M de histamina (□) e por 10^{-5} M de CCh (■) em íleo isolado de cobaia.....68
- Gráfico 4** – Curvas concentrações-resposta cumulativas ao CCh (A) e ao OC-EtOH (B) na ausência (○, ●) e na presença de 10^{-9} (▲), 3×10^{-9} (△), 10^{-8} (◆, ▼) e 3×10^{-8} M (◇, ▽) de atropina em íleo isolado de cobaia.....71
- Gráfico 5** – Curvas concentrações-resposta cumulativas à histamina (A) e ao OC-EtOH (B) na ausência (◀, ●) e na presença de 10^{-9} (○, ○), 3×10^{-9} (■, ■), 10^{-8} (□, □), 3×10^{-8} (▲, ▲), 10^{-7} (△, △) e 3×10^{-7} M (◆, ◆) de pirilamina, em íleo isolado de cobaia.....75
- Gráfico 6** – Curvas concentrações-resposta cumulativas ao OC-EtOH na ausência (●) e na presença de verapamil nas concentrações de 10^{-7} (○), 3×10^{-7} (▲) e 10^{-6} M (△), em íleo isolado de cobaia.....79
- Gráfico 7** – Efeito do OC-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por 40 mM de KCl na ausência (✕) e na presença de 10^{-6} M de pirilamina (✕) em íleo isolado de cobaia.....82
- Gráfico 8** – Curvas concentrações-resposta cumulativas ao CaCl_2 em meio despolarizante nominalmente sem Ca^{2+} na ausência (★), na presença de 3×10^{-8} (●), 10^{-7} (○), 3×10^{-7} (▲), 10^{-6} (△) e 3×10^{-6} M (▼) de verapamil (A) e na presença de 27 (●), 81 (○), 243 (▲) e 729 $\mu\text{g/mL}$ (△) do OC-EtOH (B), em íleo isolado de cobaia.....85
- Gráfico 9** – Efeito relaxante do verapamil (A) e do OC-EtOH (B) sobre as contrações tônicas induzidas por 40 mM de KCl (▶, ○) e por 3×10^{-7} M de S-(-)-Bay K8644 (■, ▶) em íleo isolado de cobaia.....89
- Gráfico 10** – Efeito do OC-EtOH sobre o trânsito intestinal na ausência (A) e na presença (B) do óleo de rícino em camundongos.....94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição da solução de Krebs modificado.....	52
Tabela 2 – Composição da solução de Krebs modificado despolarizante (KCl 70 mM) nominalmente sem cálcio.....	53
Tabela 3 – Valores de E_{max} (%) e de CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$) do OC-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por 40 mM de KCl, por 10^{-5} M de CCh ou por 10^{-6} M histamina em íleo isolado de cobaia.....	68
Tabela 4 – Valores de E_{max} (%) e de CE_{50} (M) do CCh na ausência e na presença de atropina em íleo isolado de cobaia.....	72
Tabela 5 – Valores de E_{max} (%) e de CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$) do OC-EtOH na ausência e na presença de atropina em íleo isolado de cobaia.....	72
Tabela 6 – Valores de E_{max} (%) e de CE_{50} (M) da histamina na ausência e na presença de pirilamina em íleo isolado de cobaia.....	76
Tabela 7 – Valores de E_{max} (%) e de CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$) do OC-EtOH na ausência e na presença de pirilamina em íleo isolado de cobaia.....	76
Tabela 8 – Valores de E_{max} (%) e de CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$) do OC-EtOH na ausência e na presença de verapamil em íleo isolado de cobaia.....	79
Tabela 9 – Valores de E_{max} (%) e de CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$) do OC-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por 40 mM de KCl na ausência e na presença de pirilamina em íleo isolado de cobaia.....	82
Tabela 10 – Valores de E_{max} (%) e de CE_{50} (M) do CaCl_2 na ausência e na presença de verapamil em íleo isolado de cobaia.....	86
Tabela 11 – Valores de E_{max} (%) e de CE_{50} (M) do CaCl_2 na ausência e na presença de OC-EtOH em íleo isolado de cobaia.....	86
Tabela 12 – Valores de CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$) do verapamil e do OC-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de S-(-)-Bay K8644 e por 40 mM de KCl em íleo isolado de cobaia.....	90
Tabela 13 – Efeito do OC-EtOH (2000 mg/kg) na avaliação ponderal dos camundongos fêmeas.....	92

LISTA DE ABREVIATURAS

[Ca²⁺]_c	concentração de Ca ²⁺ citosólico
[K⁺]_e	concentração extracelular de potássio
AC	ciclase de adenilil
ACh	acetilcolina
ANOVA	análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AR	ácido ricinoleico
ATP	trifosfato de adenosina
BK_{Ca}	canais de potássio ativados por cálcio de grande condutância
CaM	calmodulina
cAMP	monofosfato cíclico de adenosina
Ca_v	canais de cálcio dependentes de voltagem
CCh	carbacol
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CE₅₀	concentração de uma droga que produz 50% de seu efeito máximo
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CFTR	regulador transmembranar de condutância da fibrose cística
cGMP	monofosfato cíclico de guanosina
DAG	diacilglicerol
DE₅₀	dose de uma droga que produz 50% de seu efeito máximo
DL₅₀	dose de uma droga que mata 50% dos animais testados
e.p.m.	erro padrão da média
E_{max}	efeito máximo

G_{12,13}	proteína G ₁₂ ou proteína G ₁₃
GDP	difosfato de guanosina
GLUT	transportadores de glicose
GPCR	receptor acoplado à proteína G
G_{q/11}	proteína G _q ou proteína G ₁₁
GTP	trifosfato de guanosina
IP₃	1,4,5-trisfosfato de inositol
IPeFarM	Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos
K_{ATP}	canais de potássio sensíveis ao ATP
K_v	canais de potássio dependentes de voltagem
MLC20	cadeia leve da miosina de 20 kDa
MLCK	cinase da cadeia leve de miosina
NO	óxido nítrico
OC-EtOH	extrato etanólico da esponja <i>Oceanapia sp.</i>
OECD	<i>Organization for Economic Co-operation and Development</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAF	fator de ativação plaquetária
PGE₂	prostaglandina E ₂
PIP₂	4,5 bisfosfato de fosfatidil inositol
PKA	proteína cinase A
PKG	proteína cinase G
PLC	fosfolipase C
PMCA	Ca ²⁺ -ATPase da membrana plasmática
RhoA-GTP	pequena proteína ligante de trifosfato de guanosina
RhoGEF	fator trocador de nucleotídeo de guanina da RhoA
ROK	cinase da RhoA

RS	retículo sarcoplasmático
RyR	receptor de rianodina
SERCA	Ca ²⁺ -ATPase do retículo sarcoplasmático
sGC	ciclase de guanilil solúvel
SGLT	cotransportador de sódio/glicose/água
SK_{Ca}	canais de potássio ativados por cálcio de pequena condutância
TGI	trato gastrintestinal
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
UFRPE	Universidade Federal Rural de Pernambuco
V_m	potencial de membrana

OBS: as abreviaturas e os símbolos utilizados neste trabalho e que não constam nesta relação, encontram-se descritas no texto ou são convenções adotadas universalmente.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	27
2.1 Produtos naturais marinhos.....	28
2.2 Gênero <i>Oceanapia</i>	31
2.3 Regulação da contração e do relaxamento do músculo liso	33
2.4 Fisiopatologia da diarreia e da constipação	41
3 OBJETIVOS.....	48
3.1 Geral	49
3.2 Específicos	49
4 MATERIAL E MÉTODOS	50
4.1 Material.....	51
4.1.1 Produto teste	51
4.1.2 Animais	51
4.1.3 Substâncias e reagentes	52
4.1.4 Soluções nutritivas	52
4.1.5 Preparação do OC-EtOH para os ensaios farmacológicos.....	53
4.1.6 Equipamentos.....	53
4.2 Métodos.....	54
4.2.1 Triagem farmacológica preliminar	54
4.2.1.1 Efeito do OC-EtOH sobre o tônus basal em íleo isolado de cobaia....	54
4.2.1.2 Efeito do OC-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por KCl, por histamina ou por CCh	55
4.2.2 Investigação do mecanismo de ação espasmogênica do OC-EtOH em íleo isolado de cobaia	55
4.2.2.1 Avaliação da participação dos receptores muscarínicos no efeito espasmogênico do OC-EtOH ausência e na presença de atropina	55

4.2.2.2 Avaliação da participação dos receptores histaminérgicos no efeito espasmogênico do OC-EtOH na ausência e na presença de pirilamina	56
4.2.2.3 Avaliação da participação dos Ca_v no efeito espasmogênico do OC-EtOH na ausência e na presença de verapamil.....	56
4.2.3 Investigação do mecanismo de ação espasmolítica do OC-EtOH em íleo isolado de cobaia	57
4.2.3.1 Efeito do extrato OC-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por KCl na presença de pirilamina	57
4.2.3.2 Avaliação da participação dos Ca_v no efeito espasmolítico do OC-EtOH	57
4.2.3.2.1 Efeito do OC-EtOH frente às contrações induzidas por CaCl_2 em meio despolarizante nominalmente sem Ca^{2+}	57
4.2.3.2.2 Efeito do OC-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por S-(-)-Bay K8644	58
4.2.4 Triagem farmacológica comportamental e avaliação da toxicidade aguda do OC-EtOH em camundongos.....	58
4.2.5 Avaliação do efeito do OC-EtOH sobre o trânsito intestinal em camundongos.....	59
4.3 Análise estatística	60
5 RESULTADOS.....	61
5.1 Triagem farmacológica preliminar.....	62
5.1.1 Efeito do OC-EtOH sobre o tônus basal em íleo isolado de cobaia.....	62
5.1.2 Efeito do OC-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por KCl, por histamina ou por CCh	65
5.2 Investigação do mecanismo de ação espasmogênica do OC-EtOH em íleo isolado de cobaia	69
5.2.1 Avaliação da participação dos receptores muscarínicos no efeito espasmogênico do OC-EtOH na ausência e na presença de atropina.....	69
5.2.2 Avaliação da participação dos receptores histaminérgicos no efeito	

espamogênico do OC-EtOH na ausência e na presença de pirilamina	73
5.2.3 Avaliação da participação dos Cav no efeito espamogênico do OC-EtOH na ausência e na presença de verapamil	77
5.3 Investigação do mecanismo de ação espasmolítica do OC-EtOH em íleo isolado de cobaia	80
5.3.1 Efeito do extrato OC-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por KCl na presença de pirilamina	80
5.3.2 Avaliação da participação dos Cav no efeito espasmolítico do OC-EtOH.....	83
5.3.2.1 Efeito do OC-EtOH frente às contrações induzidas por CaCl ₂ em meio despolarizante nominalmente sem Ca ²⁺	83
5.3.2.2 Efeito do OC-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por S-(-)-Bay K8644	87
5.4 Triagem farmacológica comportamental e avaliação da toxicidade aguda do OC-EtOH em camundongos.....	91
5.5 Avaliação do efeito do OC-EtOH sobre o trânsito intestinal normal ou induzido por óleo de rícino em camundongos	93
6 DISCUSSÃO	95
7 CONCLUSÕES	108
REFERÊNCIAS.....	110
APÊNDICES	136
ANEXOS	140

1 Introdução

Os produtos naturais são utilizados desde os primórdios da humanidade, na busca por alívio e cura de doenças através da ingestão de ervas, sendo uma das primeiras formas de utilização desses produtos. Estima-se que a partir de 1985 cerca de 65% da população mundial fez a utilização de medicamentos tradicionais derivados de produtos naturais para cuidados primários à saúde, destacando que esses produtos desempenham um papel importante nos sistemas de cuidados à saúde principalmente na população dos países em desenvolvimento (VIEGAS JR; BOLZANI; BARREIRO, 2006; CRAGG; NEWMAN, 2013; OGBOURNE; PARSONS, 2014).

A alta disponibilidade de fontes naturais oferece grandes possibilidades de se descobrir substâncias de interesse terapêutico. É relatado na literatura que mais de 100 produtos naturais ou derivados deles estão em fase de desenvolvimento clínico, destacando-se aqueles para o tratamento do câncer e de doenças infecciosas e cardiovasculares (BUTLER; ROBERTSON; COOPER, 2014).

Diversas razões foram apresentadas para explicar o sucesso de produtos naturais na descoberta de drogas: alta diversidade química, descobrimento de moléculas biologicamente ativas através da evolução e a semelhança estrutural com alvos proteicos em muitas espécies (HENKEL et al., 1999; FEHER; SCHMIDT, 2003).

Incluídos nos produtos naturais, os produtos de origem marinha são fonte de compostos que demonstram, em ensaios pré-clínicos e clínicos, atividade antifúngica (D'AURIA et al., 2007), anticoagulante (JUNG et al., 2007), antibacteriana (HORIE et al., 2008), anti-inflamatória (CHAO et al., 2008), imunomoduladora (YAMADA et al., 2007; COURTOIS et al., 2008), antiviral (ARTAN et al., 2008) e espasmolítica como a alga marrom *Dictyota pulchella* (QUEIROZ et al., 2011), a alga verde *Hydrodictyon reticulatum* (GUTIERREZ et al., 2012), a caulerpina, um alcaloide isolado de algas do gênero *Caulerpa* (CAVALCANTE-SILVA et al., 2013; 2016) e a microalga *Spirulina platensis* (BRITO et al., 2015a,b).

Há um grande interesse em investigar drogas obtidas diretamente de produtos naturais ou seus derivados que atuem sobre o músculo liso, uma vez que esse está presente nas paredes de vários órgãos do corpo, incluindo os vasos sanguíneos, o estômago, a bexiga, as vias aéreas e os intestinos. A regulação/desregulação da contratilidade do músculo liso desempenha um papel importante em muitos processos fisiopatológicos como hipertensão, asma, disfunção erétil, cólicas renais e uterinas, diarreia e constipação (WEBB, 2003).

A diarreia é um processo caracterizado pelo aumento no número de fezes (3

ou mais vezes em um período de 24 horas) podendo ser aquosa e de pouca consistência ou, pelo aumento na frequência de defecação comparado ao que é normal para cada indivíduo (OMS, 2013). Este distúrbio leva a óbito milhares de pessoas por ano, sendo a faixa etária mais frequente a das crianças menores de 5 anos, o que acarreta um elevado custo aos sistemas de saúde (VENKATESAN et al., 2005; GUTIERREZ et al., 2008). Já a constipação é definida como uma condição em que o indivíduo tem menos de três evacuações por semana ou as têm com fezes que são duras, secas e pequenas, tornando-se um processo doloroso ou de difícil eliminação (BIELEFELDT; LEVINTHAL; NUSRAT, 2016).

Apesar do aumento nos estudos na busca de um melhor tratamento para a diarreia e constipação e das melhorias nas condições de nutrição, de higiene e de saneamento (PARASHAR; BRESEE; GLASS, 2003), sabe-se que ainda não existe tratamentos específicos para essas desordens, esse fato leva ao estímulo de novas pesquisas para o tratamento e prevenção de doenças gastrintestinais com base nas práticas tradicionais, que refere-se ao conjunto de práticas em saúde desenvolvidas antes do que se classifica como medicina moderna (ou convencional) e que ainda hoje são praticadas por diversas culturas em todo o mundo, ou a partir de produtos naturais (GUO et al., 2014).

Diante do exposto, decidiu-se investigar uma possível atividade sobre a musculatura lisa intestinal, bem como uma provável atividade antidiarreica da esponja *Oceanapia sp.*, visto que há relatos na literatura de produtos naturais de origem marinha que apresentaram ação espasmolítica, atribuindo aos produtos naturais marinhos um grande valor, uma vez que são, reconhecidamente, uma fonte rica de metabólitos secundários com potencial atividade sobre o músculo liso.

2 Fundamentação teórica

2.1 Produtos naturais marinhos

Ao longo dos séculos, os produtos oriundos da natureza tem sido a maior fonte de inspiração para diversas áreas da química e da ciência de um modo geral. Usando, copiando ou modificando as moléculas sintetizadas pelos seres vivos, o homem tem obtido inovações para o seu benefício em diversas áreas e, entre elas, a produção de fármacos (COSTA-LOTUFO et al., 2009).

Os produtos naturais são considerados como uma biblioteca natural de química combinatória que pode proporcionar substâncias com diversidade química e farmacológica (WANG et al., 2014).

Os produtos naturais têm sido o sustentáculo da terapia para as doenças durante a maior parte da história do homem e são um componente importante dos produtos farmacêuticos modernos que usamos para tratar doenças humanas (MAYER et al., 2010). De 70 a 90% da população de algumas nações industrializadas como, por exemplo, Canadá, França, Alemanha e Itália fazem o uso da medicina complementar para a recuperação da saúde (WALJI; WIKTOROWICZ, 2013). Durante o século passado, um grande número de produtos naturais foi associado com benefícios para a saúde, na prevenção e no tratamento de diversas doenças (MORA-PALE et al., 2014).

Dentre a diversidade de produtos naturais, os de origem marinha têm atraído a atenção de diversos cientistas, devido a produção de compostos importantes no combate a várias doenças (MOVAHHEDIN et al., 2014), apesar de não apresentarem um histórico significativo de uso popular. Das mais de 53.000 espécies de produtos naturais utilizadas na prática da medicina herbal para os cuidados primários à saúde, poucos são de origem aquática. Alguns relatos na literatura descrevem que os antigos fenícios utilizavam moluscos marinhos para produzir corantes roxos para tecidos e algas para fertilizar o solo (PAN et al., 2014).

No início, os esforços para a descoberta de produtos naturais marinhos tinham como foco aqueles organismos mais visíveis e facilmente coletados. De fato, antes do advento do mergulho, a exploração do mundo marinho definhou por trás do mundo terrestre, uma incapacidade de adentrar a vida marinha além do intertidal (SUZUKI; VAIRAPPAN, 2005),

Com a intensificação da exploração marinha, outros grupos de organismos foram descobertos e estudados, e o repertório de espécies cresceu. Na virada do

século, os produtos naturais marinhos tinham se tornado uma importante fonte de produtos naturais (FAULKNER, 2002).

Em todo mundo, as margens costeiras de oceanos são ricas em diversidade de espécies, sendo assim, os ecossistemas marinhos podem ser considerados como detentores da maior biodiversidade filética, com potencial biotecnológico associado praticamente ilimitado (GRINDBERG et al., 2008).

Os oceanos cobrem cerca de dois terços da superfície do planeta e a biodiversidade de espécies que vivem no seu interior é superior ao da terra, aproximadamente 95% da biosfera (MENÉNDEZ, 2005). Toda essa diversidade de espécies é resultado da variabilidade de ambientes marinhos, com diferentes temperatura, pressão, nutrientes, luz solar, dentre outros (RAY; GRASSELE, 1991). Embora a biodiversidade dos oceanos seja superior à do ambiente terrestre, incluindo representantes de 34 dentre os 36 filos descritos (COSTA-LOTUFO et al., 2009), a busca por novos compostos químicos ainda é recente (cerca de 30 anos) (DE LA CALLE, 2007).

Nos últimos anos, os produtos naturais de origem marinha, ganharam uma maior importância no setor farmacêutico, devido à descoberta de agentes terapêuticos para combater diversas doenças que afetam os seres humanos. Numerosas publicações em revistas científicas atribuem às substâncias bioativas de origem marinha, atividades farmacológicas como anticâncer, antiviral, antimaláricos, antifúngicas, anticoagulantes, antibacteriana, entre outras (JIMÉNEZ et al., 2007). Isso faz com que sejam grandes produtoras de produtos naturais marinhos, com mais de 200 novos compostos reportados a cada ano durante a última década (LAPORT; SANTOS; MURICY, 2009). Estima-se que mais de 15.000 novos produtos naturais marinhos tenham sido descobertos, sendo 8.368 novos compostos na década entre 2001 e 2010. Isto constitui mais da metade de todas as substâncias marinhas encontradas desde 1951 (HU et al., 2011; MEHBUB et al., 2011).

Os estudos com organismos marinhos iniciaram com o isolamento dos nucleosídeos espongouridina e espongotimidina, a partir da esponja marinha *Tethya crypta* (BERGMANN; FEENEY, 1951). Esses compostos foram o incentivo para a descoberta de outras substâncias utilizadas na terapêutica, como exemplo tem-se a citarabina, utilizada como um agente antineoplásico e a vidarabina, um agente antiviral (MAYER et al., 2010).

Em 2004, a *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou um novo fármaco para tratamento da dor cônica, o ziconotideo, isolado do veneno de um caracol da espécie *Conus magus* e em 2007, foi aprovado pela *European Agency for the Evaluation of Medicinal Products* (EMA) a trabectedina, um alcaloide isolado da ascídia *Ecteinascidia turbinata* e utilizado para tratar sarcomas de tecidos moles (MOLINSKI et al., 2009).

Dessa forma, estudos com a utilização de produtos aquáticos tem recebido destaque nas pesquisas farmacológicas, devido a seus compostos biologicamente ativos conferirem benefícios significativos à saúde humana, tais como ações antitrombótica por antagonismo do receptor de trombina (erylosides, dissacarídeos encontrados na esponja *Erylus formosus*) (STEAD et al., 2000); anti-inflamatória por inibição da ciclo-oxigenase do tipo 2 (cembranoides isolados de corais da espécie *Lobophytum crassum*) (CHAO et al., 2008); anti-hipertensiva por inibição da síntese de tromboxano A₂ (fucoxantina, carotenoide extraído das microalgas *Undaria pinnatifida*) (RICCIONI et al., 2011).

Além dessas, pode-se citar outras ações sobre o músculo liso, como atividade vasorrelaxante em aorta torácica de rato ao utilizar-se uma dieta a base de algas do gênero *Spirulina* (JUÁREZ-OROPEZA et al., 2009); em aorta de rato para a alga verde *Cladophora patentiramea* (LIM; MOK, 2010); em artéria mesentérica para a alga marrom *Dictyota pulchella* (QUEIROZ et al., 2011); a microalga verde-azulada *Spirulina platensis* promove alterações na reatividade muscular contrátil e relaxante em aorta e traqueia de rato (BRITO et al., 2015a,b). Além disso, é relatada a atividade espasmolítica em músculo liso intestinal para a alga verde *Hydrodictyon reticulatum* (GUTIERREZ et al., 2012); em íleo de cobaia para o alcaloide indólico caulerpina, componente majoritário de algas do gênero *Caulerpa* (CAVALCANTE-SILVA et al., 2013; 2016) e a atividade contrátil em aorta de cobaia da callipeltin A, um peptídeo isolado das esponjas *Callipelta* sp. e *Latrunculia* sp. (TREVISI et al., 2004).

Inseridas no contexto de produtos naturais marinhos encontram-se as esponjas marinhas (Filo Porifera) que compartilham muitas características com protozoários unicelulares, particularmente no que diz respeito à nutrição, organização celular, troca gasosa, reprodução e resposta a estímulos ambientais (BRUSCA; BRUSCA, 1990). As esponjas são exclusivamente animais aquáticos que dominam muitos habitats bentônicos, podendo atingir tamanho considerável (1 m ou mais), particularmente em

águas tropicais. São animais filtradores sésseis que não tem tecidos ou órgãos sensoriais (HOOPER, 2000), bombeiam grandes volumes de água através de um sistema de canal único e altamente vascularizado, deixando a água expelida essencialmente estéril. Os nutrientes são adquiridos por fagocitose de bactérias que são removidos da coluna de água (REISWIG, 1974).

É de interesse científico e industrial, o fato de como e por que as esponjas marinhas possuem uma grande diversidade de novos produtos naturais. Esses organismos sobrevivem no oceano por mais de 600 milhões de anos (LI; CHEN; HUA, 1998), ao longo das vastas mudanças impostas ao oceano, das águas frescas às águas salinas, do intertidal para alto mar, das águas tropicais às águas congeladas, indicando uma tremenda capacidade de responder e adaptar-se às condições ambientais variadas ao longo deste período (HENTSCHEL et al., 2002).

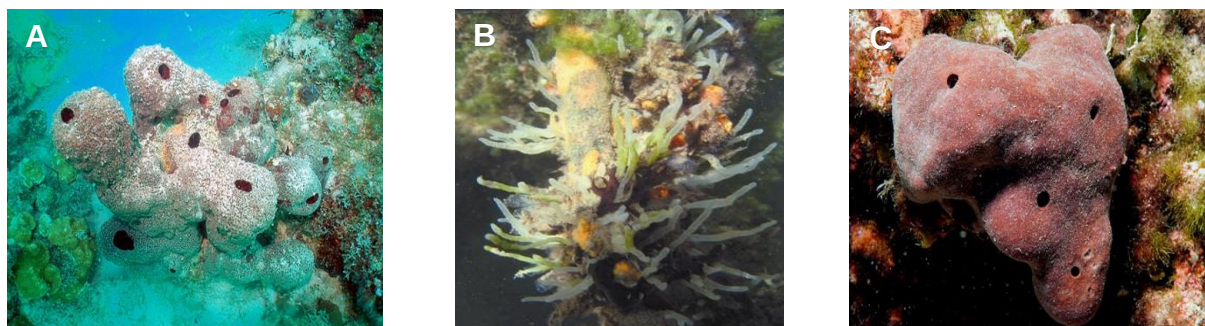
As esponjas são reconhecidas como as mais ricas fontes de produtos naturais marinhos, com aproximadamente 4.851 compostos, até a data, contribuindo para cerca de 30% de todos os produtos naturais marinhos descobertos. Vale salientar que 1.499 novos compostos foram isolados entre os anos de 2008 a 2012 (BLUNT et al., 2014).

Assim, de acordo com a grande quantidade de produtos naturais provenientes de esponjas marinhas, estudos têm revelado um amplo espectro de atividades biológicas destes compostos, incluindo antiviral, antibacteriano, antifúngico, antiprotozoário, anti-helmíntico, anti-inflamatória, imunossupressora, neuroprotetora, entre outras (BLUNT et al., 2005).

2.2 Gênero *Oceanapia*

As esponjas são atualmente divididas em 128 famílias e 680 gêneros (MEHBUB, 2014). Dentre estes, pode-se citar o gênero *Oceanapia*, pertencente ao reino Animalia e a família Oceanapiidae. Este gênero possui cerca de 100 espécies que estão distribuídas nos mares tropicais do mundo. Algumas de suas espécies podem ser encontradas no Brasil (Figura 1), a exemplo das espécies *Oceanapia bartschi*, *Oceanapia nodosa* e *Oceanapia petrosia* (VAN SOEST et al., 2015).

Figura 1 – Fotos das espécies *Oceanapia bartschi* (A), *O. nodosa* (B) e *O. petrosia* (C).



Fonte: coralpedia.bio.warwick.ac.uk/en/sponges/oceanapia_bartschi.
biogeodb.stri.si.edu/bioinformatics/dfm/metas/view/13609.
natuurlijkmooi.net/adriatische_zee/sponzen/petrosia_ficiformis.htm.

Estudos relacionados ao gênero *Oceanapia* são escassos na literatura científica, sendo possível citar algumas atividades biológicas, como antifúngica de *Oceanapia phillipensis* (NICHOLAS et al., 1999), antimicrobiana de *Oceanapia nodosa* (MURICY et al., 1993) e *Oceanapia sp.* (MATSUNAGA et al., 2000), antibacteriana de *Oceanapia fistulosa* (MANCINI et al., 2004), atividade anticancerígena de *Oceanapia sagittaria* (KIJJOA et al., 2007), atividade antimitótica da *Oceanapia bartschi* (MORA-CRISTANCHO et al., 2007).

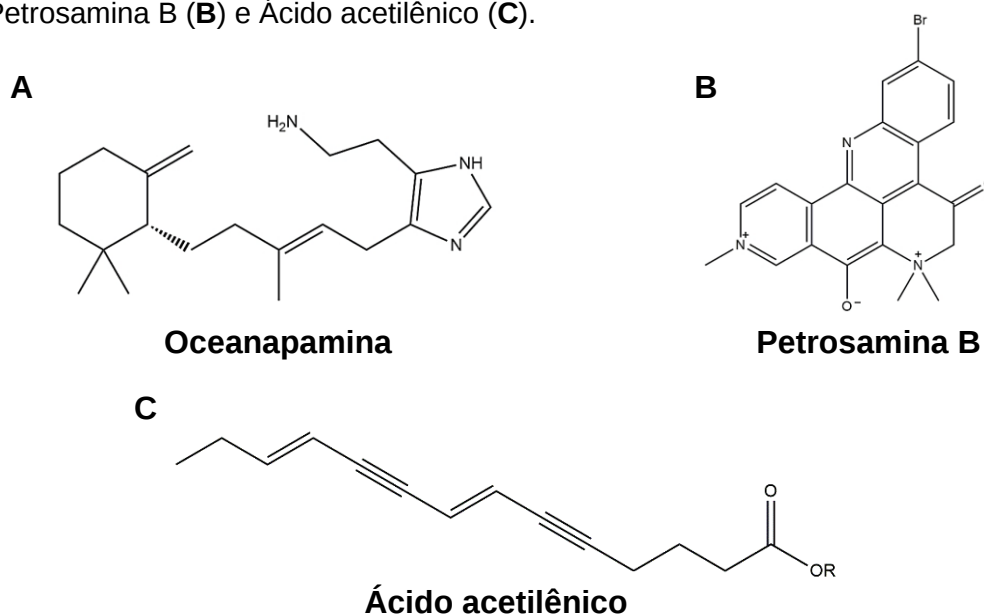
Espécies do gênero *Oceanapia* produzem diferentes classes de metabólitos, incluindo os alcaloides, esfingolipídios, esteroides, acetilenos, tiocianatos, entre outros (IBRAHIM et al., 2013) e dentre as classes de metabólitos que já foram encontradas pode-se citar o glicosídeo oceanapiside da esponja *Oceanapia phillipensis*, que possui efeito antifúngico contra *Candida glabrata* (NICHOLAS et al., 1999), os alcaloides kuanoniaminas A e C, isolados de *Oceanapia sagittaria* que apresentaram atividade anticâncer (KIJJOA et al., 2007).

Da esponja *Oceanapia sp.*, espécie selecionada para este trabalho, também já foram isolados alguns metabólitos secundários (Figura 2), a citar o ácido acetilênico com atividade antimicrobiana (MATSUNAGA et al., 2000); a oceanalina A, um esfingolipídio híbrido, com atividade antifúngica (MAKARIEVA et al., 2005) e os glicoesfingolipídios, cerebrosídeos 1 e 3 (GUZII et al., 2006).

Uma outra classe de metabólitos bastante encontradas na espécie *Oceanapia sp.* são os alcaloides como, por exemplo, oceanapamina, que apresentou atividade antifúngica (BOYD; HARPER; FAULKNER, 1995), kuanoniaminas C e D com atividade anticancerígena (EDER et al., 1998); tiocianato A, B e C com atividade

nematicida (CAPON et al., 2001); os alcaloides piridopirimidina e petrosamina B que inibiram a enzima aspartil semialdeído desidrogenase da *Helicobacter pylori* (CARROLL et al., 2005); os alcaloides quinolizidina, petrosina e xestospongina (SINGH; DAS; NAIK, 2011); bem como os alcaloides sagitol e sagitol C que apresentaram atividade anticâncer (IBRAHIM et al., 2013).

Figura 2 – Metabólitos secundários isolados do gênero *Oceanapia*: Oceanapamina (A), Petrosamina B (B) e Ácido acetilênico (C).



Fonte: BOYD; HARPER, 1995; CARROLL et al., 2005; MATSUNAGA et al., 2000.

2.3 Regulação da contração e do relaxamento do músculo liso

Há um grande interesse em se investigar drogas obtidas diretamente de produtos naturais, em especial os de origem marinha, que atuem sobre a musculatura lisa, pois esse músculo é o principal responsável pelo controle da maioria dos órgãos ocos dos sistemas do corpo (WATTERSON, RATZ, SPIEGEL, 2005). As células da musculatura lisa estão presentes nas paredes de vários órgãos do corpo, incluindo os vasos sanguíneos, o estômago, a bexiga, as vias aéreas e o trato gastrointestinal (TGI). A regulação/desregulação da contração desse músculo desempenha um papel integral em muitos processos fisiopatológicos, por exemplo, a desregulação da contração do músculo liso é importante na hipertensão, no vasoespasma cerebral e coronário, na asma brônquica, no trabalho de parto, na disfunção erétil, nas cólicas abdominais, na diarreia e na constipação (WIRTH; OFFERMANN, 2012).

Com base em estudos funcionais e farmacológicos no intestino, os receptores muscarínicos são significativos na mediação da transmissão colinérgica no músculo liso intestinal (COOKE, 2000; EGMEN, 2001; HARRINGTON et al., 2010). Esses receptores são acoplados à proteína G (GPCR), que medeia a transmissão pós-sináptica excitatória lenta mediante a ligação da acetilcolina (ACh) (HULME, 1990). Existem cinco subtipos de receptores muscarínicos (M_1 - M_5), que são ubiquamente expressos por vários tipos de células (neurônais e não neurônais) (LEVEY, 1993) e são, cada um acoplado a diferentes proteínas G, que determinam as respostas intracelulares após ligação da ACh. Os receptores muscarínicos M_1 , M_3 e M_5 estimulam a cascata de sinalização via $G_{q/11}$, com consequente aumento da concentração de cálcio citosólico ($[Ca^{2+}]_c$), enquanto M_2 e M_4 medeiam a inibição da ciclase de adenilil (AC) via G_i/G_o e consequente diminuição dos níveis de monofosfato cíclico de adenosina (cAMP) (CAULFIELD; BIRDSALL, 1998). Dos cinco subtipos de receptores muscarínicos, os subtipos 1, 2 e 3, influenciam significativamente a atividade intestinal, particularmente a motilidade e a secreção.

A motilidade intestinal é resultado de contrações de células do músculo liso que são regulados por excitabilidade intrínseca, mecanismos de sensibilidade e entrada do Ca^{2+} a partir de uma variedade de sistemas de controle de ordem superior (por exemplo, células intersticiais de Cajal, neurônios motores entéricos, hormônios e substâncias parácrinas). Em doenças inflamatórias novas influências reguladoras são impostas devido à liberação de substâncias bioativas. As células imunes residentes e células de origem hematopoiética são recrutadas para o músculo, como parte da resposta inflamatória. Entre estas células estão os mastócitos que podem ser encontrados em abundância na resposta inflamatória, que por sua vez vão liberar uma variedade de substâncias bioativas, incluindo citocinas, interleucinas e histamina (GELBMANN; MESTERMANN; GROSS, 1999; RIJNIERSE; NIJKAMP; KRANEVELD; 2007).

A histamina, um mediador importante nas doenças alérgicas e inflamatórias (DY; SCHNEIDER, 2004), é uma amina biogênica sintetizada a partir do aminoácido histidina. Muitos estímulos, incluindo alérgenos, neuropeptídeos e estresse podem ativar os mastócitos causando a liberação dessa amina (ZAMPELI; TILIGADA, 2009). A histamina, agindo paracrinamente, pode ser capaz de restabelecer a excitabilidade das células do músculo liso (WOOD, 2006; BREUNIG et al., 2007). Existem quatro

receptores de histamina, H₁, H₂, H₃ e H₄. Os receptores H₁ são amplamente expressos nos enterócitos, no músculo liso, nos vasos sanguíneos, nas células imunes e nas células ganglionares do plexo mioentérico do TGI humano. Os receptores H₂ estão localizados nas células parietais do estômago, no epitélio intestinal, nas células do sistema imunológico e nos gânglios mioentéricos (SANDER et al., 2006). Embora os agonistas dos receptores H₃ apresentem efeitos pronunciados sobre neurônios excitatórios da submucosa do intestino delgado e grosso humano, sugerindo a expressão desses receptores em humanos, níveis mínimos de RNAm do receptor H₃ foram detectados no TGI humano (5 de 66 amostras) (KIM et al., 2011). A expressão transcricional do receptor H₄ é menor do que H₁ e H₂ no estômago humano, intestino delgado e cólon, e é encontrado principalmente em leucócitos na mucosa e submucosa dos vasos sanguíneos do cólon (ODA et al., 2000; LIU et al., 2001).

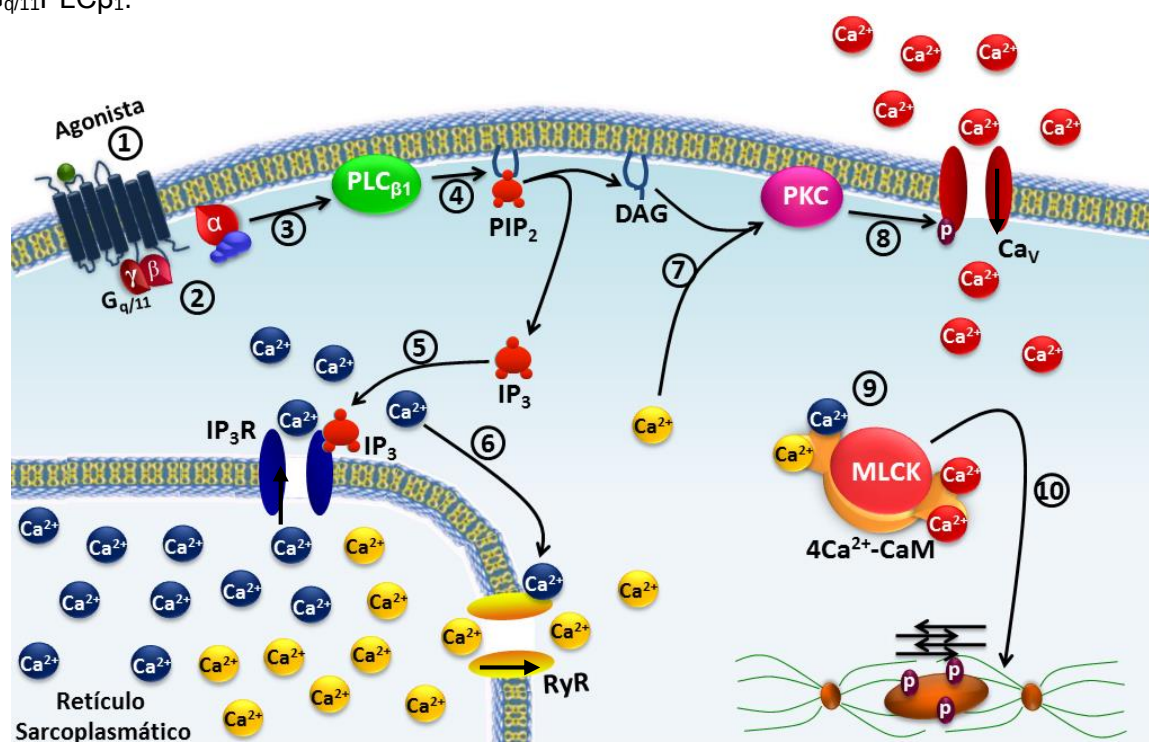
O efeito contrátil produzido tanto pela histamina como pelo carbacol (CCh), um agonista dos receptores muscarínicos, envolve ativação da via de sinalização G_{q/11}-PLC β , após a ligação aos receptores H₁ (BOLTON, 1979; HILL et al., 1997) e M₃ (CAULFIELD; BIRDSALL, 1998), respectivamente, para dar início a uma resposta contrátil no músculo liso intestinal através do acoplamento misto (fármaco-mecânico e eletromecânico), que acontece quando a contração promovida por um agonista é maior que a observada só com a mudança do potencial de membrana (V_m) (REMBOLD, 1996).

O acoplamento fármaco-mecânico (Figura 3) envolve a ativação de receptores de membrana presentes na superfície celular, levando, em última instância, a um aumento da [Ca²⁺]_c. Por exemplo, a ativação de receptores acoplados à proteína G_{q/11} presentes na membrana plasmática de músculos lisos pode ativar a fosfolipase C- β ₁ (PLC- β ₁) promovendo a hidrólise do 4,5 bisfosfato de fosfatidil inositol (PIP₂) em diacilglicerol (DAG) e 1,4,5 trisfosfato de inositol (IP₃), sendo este último responsável pela liberação de Ca²⁺ dos estoques intracelulares através de canais sensíveis ao IP₃, aumentando a [Ca²⁺]_c (OGUT; BROZOVICH, 2003).

O primeiro alvo para o acúmulo de Ca²⁺ no meio citosólico é a calmodulina (CaM), um membro da família de proteínas ligantes de Ca²⁺. A ligação de 4 íons Ca²⁺ à CaM proporciona uma mudança conformacional nesta proteína e sua subsequente interação com a cinase da cadeia leve da miosina (MLCK). Esta associação resulta em uma mudança conformacional no complexo [4Ca²⁺-CaM-MLCK] deslocando a

seqüência autoinibitória da MLCK para expor seu sítio catalítico. Essa série de eventos leva à ativação da MLCK e subsequente fosforilação da serina 19 (Ser¹⁹) da subunidade regulatória da cadeia leve da miosina de 20 kDa (MLC20). A fosforilação da MLC20 é o evento regulatório primário para a produção de força em músculos lisos e permite o desencadeamento do mecanismo de ciclicização das pontes cruzadas entre os filamentos de actina e de miosina, com consequente desenvolvimento da contração (GARRET; GRISHAM, 1995; REMBOLD, 1996; OGUT; BROZOVICH, 2003).

Figura 3 – Esquema do mecanismo fármaco-mecânico da contração no músculo liso via $G_{q/11}$ PLC β_1 .



Fonte: CORREIA 2013.

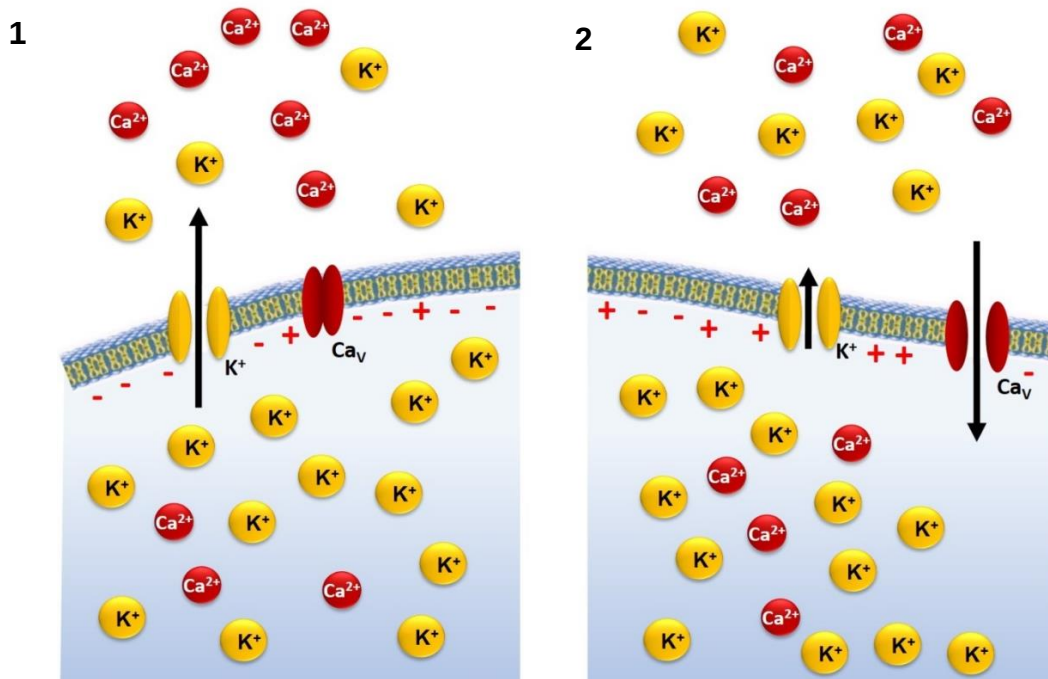
1. O agonista se liga ao seu receptor do tipo GPCR na membrana plasmática; 2. A proteína $G_{q/11}$ troca GDP por GTP na sua subunidade α , tornando-se ativa; 3. A subunidade $\alpha_{q/11}$ -GTP ativa a enzima PLC β_1 ; 4. A PLC β_1 cliva o lipídio de membrana PIP₂ em IP₃ e DAG; 5. O IP₃ migra pelo citoplasma e ativa o IP₃R presente na membrana do retículo sarcoplasmático (RS), liberando o Ca²⁺ dos estoques; 6. O Ca²⁺ liberado ativa o RyR, fazendo com que mais Ca²⁺ seja liberado para o citoplasma; 7. O Ca²⁺ que foi liberado, juntamente com o DAG que permaneceu ancorado na membrana ativam a PKC; 8. A PKC ativada fosforila os canais de cálcio sensíveis à voltagem do tipo 1 (Cav1) fazendo com que este se abra e permita o influxo de Ca²⁺ através dos mesmos; 9. O aumento da [Ca²⁺]_c faz com que este se ligue com maior facilidade à CaM formando o complexo 4Ca²⁺-CaM. Este complexo ativa a MLCK; 10. A MLCK ativada fosforila a MLC e esta se torna ativa e interage com os filamentos de actina, desencadeando a contração do músculo liso.

Uma via alternativa que contribui para a contração no músculo liso é através da modulação da fosfatase da cadeia leve da miosina (MLCP), principalmente pela

pequena proteína ligante de trifosfato de guanosina (RhoA-GTP) e a sua cinase associada (ROK), uma proteína cinase serina/treonina (KARAKI et al., 1997; HORI; KARAKI, 1998). Vários agonistas contráteis que aumentam a $[Ca^{2+}]_c$ via GPCRs, acoplados principalmente, às proteínas $G_{12,13}$ ou $G_{q/11}$, levam a ativação direta ou indireta do fator trocador de nucleotídeo de guanina da RhoA (RhoGEF), que ativa a RhoA, por trocar difosfato de guanosina (GDP) por GTP nessa proteína (SOMLYO; SOMLYO, 2003). A RhoA-GTP ativa sua cinase associada, a ROK, essa, por sua vez, fosforila a MLCP, tornando-a inativa (KIMURA et al., 1996). Assim, a fosforilação da MLC induzida pela MLCK torna-se ainda mais efetiva, auxiliando na contração do músculo liso (MURTHY, 2006; FEHER, 2012).

Por sua vez, o acoplamento eletromecânico, diferente do fármaco-mecânico que necessita da ligação de um agonista ao seu receptor, leva a resposta contrátil através da despolarização de membrana associada ao aumento da concentração extracelular de potássio ($[K^+]_e$) (Figura 4) ou da ligação de bloqueadores dos canais de K^+ , levando a uma ativação dos Cav e, conseqüente, a contração do músculo liso (REMBOLD, 1996).

Figura 4 – Acoplamento eletromecânico da contração muscular lisa pelo aumento da concentração extracelular de K^+ .



Fonte: SOUZA, 2014.

1. Durante o repouso, o gradiente químico favorece o efluxo de íons K^+ através de seus canais de vazamento, deixando a região perimembranar interna das células musculares lisas polarizadas negativamente; **2.** um aumento na $[K^+]_e$ diminui o efluxo desses íons, havendo acúmulo de cargas positivas na região perimembranar interna; a célula despolariza, ocasionando a ativação dos Ca_v que leva ao influxo de Ca^{2+} com consequente contração.

A principal porta de entrada para o Ca^{2+} que vem do meio extracelular são os Ca_v (CATTERALL, 2000), os quais estão presentes na membrana celular da maioria das células excitáveis (ALEXANDER; MATHIE; PETERS, 2007). A entrada de cálcio em músculo liso visceral é controlada pelo potencial de membrana, uma vez que este determina a abertura dos Ca_v (SHMIGOL; EISNER; WRAY, 1998; WRAY; BURDYGA; NOBLE et al., 2005).

Os Ca_v fazem parte de uma família constituída por 10 membros, sendo classificadas de acordo com as características funcionais como, por exemplo, a subfamília dos Ca_v1 ou Ca_v-L ($Ca_v1.1$, $Ca_v1.2$, $Ca_v1.3$ e $Ca_v1.4$), uma característica desses canais é que são lentos no processo de ativação/inativação que levam a prolongadas correntes de Ca^{2+} . Os Ca_v1 são sensíveis a di-hidropiridina e ativados por alta voltagem (ALEXANDER; MATHIE; PETERS, 2007), são encontrados nas células musculares lisas (CATTERALL, 2011) e são alvos de bloqueadores de canais de Ca^{2+} usados na terapêutica (WATERMAN, 2000).

Ainda existem duas grandes subfamílias: dos Cav2, os Cav-P/Q (Cav2.1); os Cav-N (Cav2.2) e os Cav-R (Cav2.3), onde diferentemente dos Cav-L são insensíveis a di-hidropiridinas e precisam de uma grande despolarização para serem ativados, sendo mais encontradas em neurônios; e a subfamília dos Cav3 ou Cav-T (Cav3.1, Cav3.2 e Cav3.3), também insensíveis à di-hidropiridinas e ativados por fraca despolarização (CATTERALL, 2011).

A atividade espasmolítica está relacionada com a capacidade de determinadas substâncias de interferir com o mecanismo de contração do músculo liso. Esta atividade pode ser observada quando antagonistas como a atropina ou pirlamina, ao se ligar ao receptor muscarínico ou histaminérgico, respectivamente, acoplados à $G_{q/11}$, impedem que ocorra a transdução do sinal que levaria à contração de músculos lisos como a do intestino (BROWN; TAYLOR, 2006).

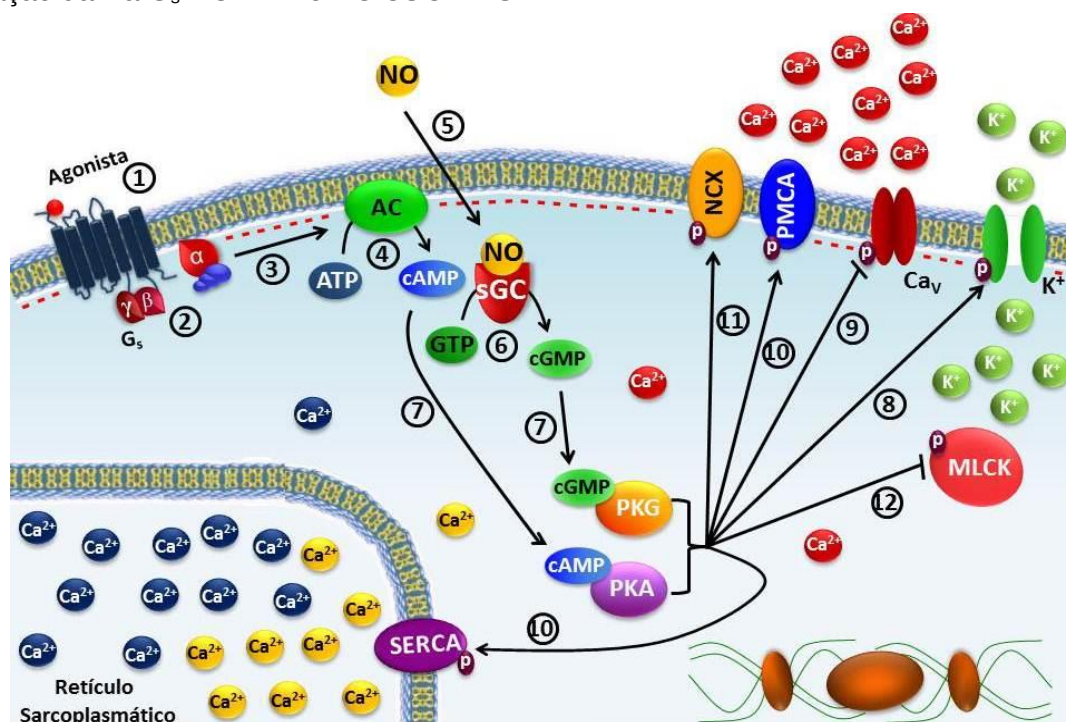
Como foi descrito anteriormente, o aumento na $[Ca^{2+}]_c$ promove a contração muscular, sendo assim, a diminuição na concentração deste íon causa o relaxamento muscular (SOMLYO; SOMLYO, 1994). Assim como na contração, o relaxamento muscular também ocorre por dois mecanismos: o acoplamento fármaco-mecânico e o eletromecânico (WOODRUM; BROPHY, 2001).

O acoplamento fármaco-mecânico do relaxamento muscular (Figura 5) pode ocorrer o envolvimento da via GPCR acoplado à proteína G_s , cuja subunidade α ativa a ciclase de adenilil (AC) e, conseqüentemente, geração de cAMP, ou através da geração do óxido nítrico (NO) tanto dos nervos como das células musculares lisas, estimula a atividade da ciclase de guanilil solúvel (sGC) que induz a formação de monosfato cíclico de guanosina (cGMP) (MURTHY, 2006). O aumento desses nucleotídeos cíclicos nas células musculares lisas leva à ativação das suas respectivas proteínas cinases A e G (PKA e PKG) (PUETZ; LUBOMIROV; PFITZER, 2009), a PKA e a PKG levam a um aumento na atividade da Ca^{2+} -ATPase tanto do RS (SERCA) como da membrana plasmática (PMCA), aumentando o sequestro e a extrusão de Ca^{2+} , respectivamente, diminuindo a $[Ca^{2+}]_c$; levam também a inativação do IP_3R , pela PKG, reduzindo sua capacidade de liberar o Ca^{2+} do RS; causam diminuição da $[Ca^{2+}]_c$ por ativação do trocador Na^+/Ca^{2+} ; promovem a inibição da MLCK, reduzindo sua afinidade pelo complexo $4Ca^{2+}$ -CaM, causando uma redução nos níveis de rMLC fosforilada; a inibição direta dos Cav, causando uma redução da $[Ca^{2+}]_c$ por diminuir o influxo de Ca^{2+} e levam a ativação de canais de K^+ que, por hiperpolarização,

bloqueiam os Ca_v (Figura 5) (WOODRUM; BROPHY, 2001; DUTTA et al., 2002; DANILA; HAMILTON, 2004).

Já no acoplamento eletromecânico de relaxamento ocorre a abertura de canais de K^+ que vão fazer a regulação do potencial de repouso da membrana e na excitabilidade celular, sendo que a contração no músculo liso depende do balanço entre o aumento da condutância ao K^+ , gerando uma repolarização/hiperpolarização das células musculares lisas. Essa hiperpolarização também pode ocorrer pela ligação de substâncias que abram diretamente esses canais de K^+ , podendo citar a cromacalina, a levocromacalina e o nicorandil, levando a um aumento do efluxo de K^+ da célula (KNOT; BRAYDEN; NELSON, 1996).

Figura 5 - Esquema do mecanismo fármaco-mecânico do relaxamento no músculo liso pela ativação da via G_s -AC-PKA e NO-sGC-PKG.



Fonte: CORREIA, 2013.

1. O agonista se liga ao seu receptor do tipo GPCR na membrana plasmática; 2. levando a troca do GDP por GTP na subunidade α da proteína G_s (não mostrado na figura), tornando-se ativa; 3. a subunidade α_s -GTP ativa a AC; 4. a AC converte o ATP em cAMP; 5. o NO gerado tanto dos nervos como das células musculares lisas estimula a atividade da sGC; 6. a sGC converte o GTP em cGMP; 7. o cAMP e o cGMP, ativam suas respectivas proteínas cinases, PKA e PKG. Ambas as proteínas cinases fosforilam vários substratos: 8. ativam os canais de K^+ ; 9. inibem os Ca_v ; 10. aumentam a atividade da SERCA e da PMCA; 11. ativam do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Todos esses mecanismos diminuem a $[\text{Ca}^{2+}]_i$; 12. inibem a MLCK, reduzindo sua afinidade pelo complexo 4Ca^{2+} -CaM. Todos esses mecanismos impedem a ativação da rMLC e, conseqüentemente, a interação dos filamentos de miosina com os de actina, promovendo o relaxamento do músculo liso.

2.4 Fisiopatologia da diarreia e da constipação

A diarreia é a segunda principal causa de morte em crianças menores de cinco anos de idade, e é responsável pela morte de cerca de 760.000 crianças a cada ano, sendo uma das principais causas da desnutrição atingindo cerca de 1,7 bilhão de pessoas por ano (WHO, 2013). No Brasil, é relatado que no período de 1995 a 2005, ocorreram 39.421 mortes por diarreia e 1.505.800 internações associadas a esta doença em crianças menores de um ano de idade no Brasil (VENKATESAN et al., 2005; GUTIERREZ et al., 2008; OLIVEIRA; LATORRE, 2010). As doenças diarreicas entre os anos de 2000 e 2014, acometeram mais de 14 milhões de pessoas, ocasionando mais de 15 mil internações por ano em todas as faixas e levando mais de 1,4 milhão de crianças menores de 5 anos a internação. De 2011 a 2014 foram relatados quase 11 mil mortes causadas por doenças diarreicas (BRASIL, 2015).

A diarreia pode durar vários dias, levando a uma perda importante de água e de eletrólitos, que são essenciais para a regulação homeostática do organismo, sendo que a maioria das mortes causadas por essa doença dá-se justamente pela desidratação grave e pela perda significativa de líquidos. O TGI regula a absorção e a secreção de eletrólitos e de água para satisfazer as necessidades fisiológicas do corpo, onde mais de 98% dos 10 litros de fluido que entram diariamente no intestino adulto são reabsorvidos. A água restante presente nas fezes está relacionada principalmente, ao teor de fibra não digerida (KEUSCH, 2001).

A diarreia é, por convenção, caracterizada por três ou mais evacuações de fezes líquidas ou pastosas num período de 24 horas (WHO, 2013). O conteúdo líquido é o principal determinante do volume e da consistência das fezes, mas outros fatores também contribuem para a formação do bolo fecal como, por exemplo, a intensidade da propulsão (VITALI et al., 2006).

Do ponto de vista clínico, existem três tipos de diarreia: a diarreia aquosa aguda, que é caracterizada por durar várias horas ou dias, incluindo a diarreia induzida pela cólera; a diarreia aguda sanguinolenta, também chamada de disenteria; e a diarreia crônica, que se define por durar 14 dias ou mais (WHO, 2013).

A doença diarreica aguda pode ser causada por infecção via bactérias, vírus ou parasitas, por alergia alimentar, por intoxicação alimentar ou pelo uso de medicamentos (FELDMAN; FRIEDMAN; BRANDT, 2010). É uma das doenças mais

comuns em crianças em todo o mundo, caracterizando-se pelo aparecimento abrupto. É importante ressaltar que a diarreia atinge pessoas de qualquer faixa etária, mas é na infância que esta afecção causa maior mortalidade. Ela figura como a terceira causa mais comum de doenças em crianças dos países em desenvolvimento e é responsável por cerca de um terço de todas as hospitalizações entre os menores de cinco anos (PEREIRA; CABRAL, 2008).

Geralmente é uma doença autolimitada que dura de cinco a sete dias, mas é uma queixa comum e resulta em um consumo significativo de recursos para sistemas de saúde. Sua principal complicação, especialmente na população pediátrica e especificamente em lactentes, é a desidratação grave. Por conseguinte, o objetivo do tratamento é a prevenção, sendo a principal terapia a utilização de sais orais de reidratação, no entanto, eles não reduzem a duração da doença ou perda de fluidos (SÁEZ; CIFUENTES, 2015).

Por sua vez, a diarreia sanguinolenta aguda é considerada uma emergência médica, uma vez que suas causas são frequentemente graves. Embora o leque de possíveis causas seja amplo, as infecciosas são primordiais e devem sempre ser priorizadas na avaliação desses pacientes. Os micro-organismos mais importantes causadores desse tipo de diarreia são: *Campylobacter*, *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC), *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* e *E. coli* O157:H7 sendo este o patógeno mais importante a considerar na avaliação de pacientes de qualquer idade por causa de sua natureza em causar gravidade (HOLTZ; NEILL, TARR, 2009).

Já a diarreia crônica é bastante comum em idosos e estima-se que 5% da população sofre de diarreia crônica e cerca de 40% destes pacientes têm mais de 60 anos (FERNÁNDEZ-BAÑARES et al., 2015). Este tipo de diarreia é geralmente associada a uma série de causas não infecciosas, incluindo medicamentos, Síndrome do Intestino Irritável, hipertireoidismo, insuficiência pancreática, podendo também ser ocasionada por infecções de parasitas ou fungos (LEE, 2015).

Um dos motivos para ocorrer a diarreia é quando há anormalidades na secreção ou na absorção, de acordo com isso a diarreia ainda pode ser classificada como: 1) diarreia osmótica: ocorrendo quando há um grande número de moléculas hidrossolúveis no lúmen intestinal, levando a retenção osmótica de água; 2) diarreia secretória: ocorre quando alguma interferência externa causa um aumento na capacidade da mucosa intestinal em secretar fluidos, como a invasão de alguns vírus

e enterotoxinas patogênicas (*Vibrio colerae* e *Escherichia coli*), acúmulo de ácidos biliares (ressecção ileal), dentre outros; 3) diarreia exsudativa: ocorre quando há uma inflamação e por consequência a exsudação de proteínas do soro, do sangue, do muco ou do pus, aumentando o volume fecal e causando a diarreia, nesse grupo pode-se citar as doenças inflamatórias intestinais; 4) diarreia motora: onde há um aumento no trânsito intestinal, o que ocasiona uma mistura inadequada do alimento com as enzimas digestivas, não havendo absorção do conteúdo intestinal, como pode ser observado nos casos de ressecção intestinal (CHRISTENSEN, 1994; FINE, 1998; FINE; ESCHILLER, 1999).

Do ponto de vista molecular, o mecanismo relacionado à gênese da diarreia envolve a redução da atividade do cotransportador de sódio/glicose/água (SGLT) do tipo 1 (SABINO-SILVA et al., 2010) e/ou o aumento da atividade dos canais de cloreto do tipo regulador transmembranar de condutância da fibrose cística (CFTR) na membrana luminal de enterócitos (LI et al., 2005).

O SGLT1 localiza-se principalmente no intestino delgado (WRIGHT et al., 2004) e tem uma alta afinidade para a glicose, mas a baixa capacidade de transportar esse metabólito (DIEZ-SAMPEDRO et al., 2000). Através do SGLT1, dois íons de sódio são transportados para cada molécula de glicose, sendo caracterizado por um transporte ativo secundário que é capaz de transportar a glicose para dentro da célula contra o gradiente de concentração, em um processo dependente da Na^+/K^+ -ATPase (WOOD; TRAYHURN, 2003). No estado estacionário, os íons Na^+ que entram na célula através da membrana luminal via SGLT1 são bombeados de volta ao interstício pela Na^+/K^+ -ATPase localizada na membrana basolateral, com isso a glicose concentra-se no interior da célula, um processo que permite a sua difusão para o interstício através dos transportadores de glicose por difusão facilitada (GLUTs) (BELL et al., 1990). Estudos demonstraram que para cada dois íons de Na^+ e uma molécula de glicose, o SGLT1 também transporta 264 moléculas de água e esse transporte ocorre devido a alterações no cotransportador induzidas pelos ligantes (sódio e glicose) na estrutura da proteína, durante o ciclo de transporte (ZEUTHEN et al., 2001).

A absorção intestinal da glicose ocorre principalmente no duodeno e na porção inicial do jejuno e envolve a expressão de SGLT1 e GLUT1. Em todos esses processos, os SGLTs da membrana luminal transportam a glicose do lúmen para o meio intracelular, gerando um gradiente a favor do transporte através dos GLUTs na

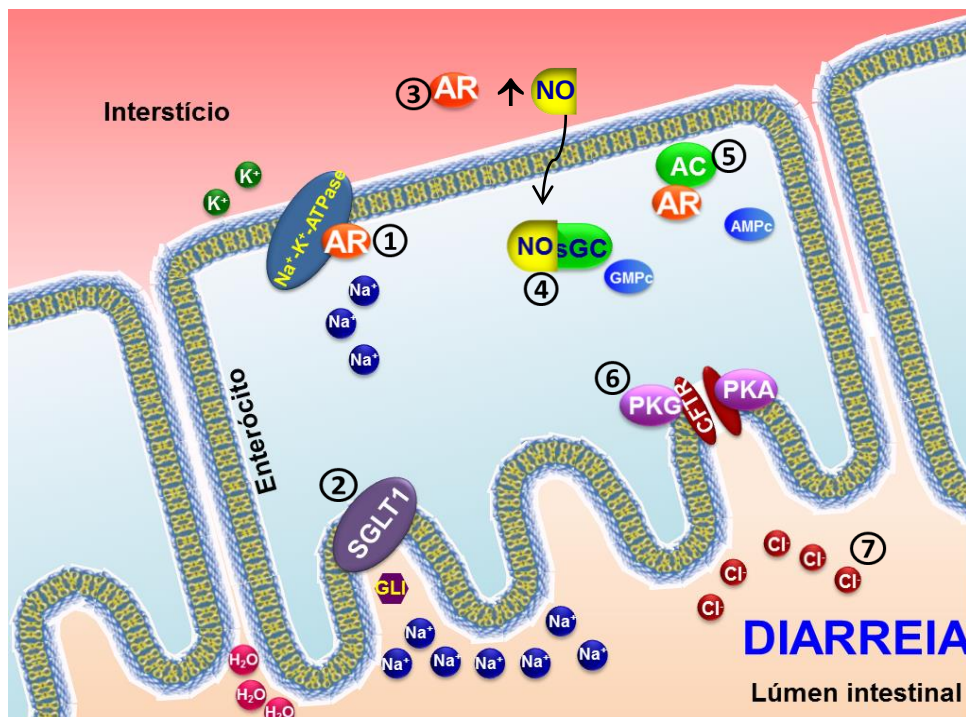
membrana basolateral, saindo do citoplasma para o interstício (WRIGHT et al., 2004).

O CFTR é o principal canal de Cl^- localizado na membrana apical das células epiteliais intestinais e desempenham um papel singular na secreção de fluidos intestinais e da homeostase. O CFTR forma complexos macromoleculares em microdomínios discretos na membrana do plasma e sua função é regulada por interações com a PKA e com a PKG, onde a ativação dessas proteínas levam a hiperatividade desses canais, levando a uma maior secreção de fluidos (MOON et al., 2015).

Nos últimos anos, a diarreia tem sido alvo de vários estudos, porém muitos outros são necessários para se desenvolver novas alternativas terapêuticas para essa doença. Neste intuito, uma importante ferramenta para se compreender a fisiopatologia desse distúrbio é a utilização de agentes indutores da diarreia em modelos experimentais de animais. Uma das formas da indução da diarreia é a utilização do óleo de rícino, obtida da espécie *Ricinus communis*, inserida na família Euphorbiaceae. Os principais constituintes do óleo são: os ácidos linoleico representando 4%, oleico com 3% e ricinoleico com aproximadamente 89%, sendo esse o principal constituinte no óleo e responsável por causar a diarreia (GAGINELLA; BASS, 1978; CONCEIÇÃO et al., 2005).

O ácido ricinoleico causa a diarreia por induzir alterações na membrana da mucosa intestinal e na permeabilidade para água e eletrólitos, resultando em um aumento na secreção e na motilidade intestinal (ZAVALA et al., 1998), ocorrendo uma inibição da Na^+/K^+ -ATPase da membrana basolateral, o que reduz a absorção normal de líquidos (IZZU, 1999); aumento na atividade da AC, levando a uma produção exacerbada de cAMP (GAGINELLA; BASS, 1978). Por ser irritante da mucosa intestinal, o ácido ricinoleico causa reações inflamatórias, leva a produção de alguns mediadores inflamatórios como o óxido nítrico (NO), o fator de ativação plaquetária (PAF) e as taquicininas (IZZU et al., 1999), além de ser um ativador do receptor da prostaglandina E_2 (EP_2) (TUNARU et al., 2012), promovendo contração da musculatura lisa e secreção intestinal (ROUF; ISLAM; RAHMAN, 2003) (Figura 6).

Figura 6 – Esquema do mecanismo de ação do óleo de rícino.



Fonte: FERREIRA, 2016.

1. O ácido ricinoleico (AR) inibe a Na^+/K^+ -ATPase; 2. O gradiente de concentração que ativaria o transportador de sódio e glicose (SGLT1) é inibido; 3. Por ser tóxico o AR induz a formação de mediadores inflamatórios como o NO; 4. O NO se liga na sGC, que irá converter GTP em cGMP; 5. O AR ativa a AC, estimulando a ciclagem do trifosfato de adenosina (ATP) em cAMP; 6. Os nucleotídeos cíclicos (cGMP e cAMP) ativam as proteínas cinases dependentes de compostos cíclicos, estas ativam os canais de Cl^- CFTR, permitindo o efluxo desse íon; 7. Todas estas alterações geram um gradiente osmótico favorecendo a passagem de água e o acúmulo de eletrólitos no lúmen intestinal, causando a diarreia.

O tratamento da diarreia é normalmente destinada a encerrar um ataque agudo, induzir a remissão, prevenção de recaídas e controlar sintomas crônicos e consiste, inicialmente, na terapia de reidratação oral, recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Nessa terapia indica-se a utilização de soluções salinas que devem conter 3,5 g de NaCl; 40 g de glicose; 2,5 g de NaHCO_3 e 1,5 g de KCl dissolvidos em 1 L de água potável. Essa combinação deve fornecer ao organismo a concentração de 90 mEq/L de sódio, 20 mEq/L de potássio, 80 mEq/L de cloreto, 30 mEq/L de bicarbonato e 111 mM/L de glicose, necessárias para reestabelecer o equilíbrio hidroeletrólítico corporal (YAKUBU; SALIMON, 2015).

Caso a terapia de reidratação oral não seja suficientemente eficaz no tratamento da diarreia, indica-se o início do tratamento farmacológico, que consiste

na utilização de drogas como agente antiperistálticos, anticolinérgicos, agentes adsorventes e absorventes, probióticos, sequestradores de ácido biliar, agonistas adrenérgicos- α , inibidores das prostaglandinas e anti-secretores (MANATSATHIT et al., 2002). A Organização Mundial de Saúde encorajou o uso de ervas medicinais tradicionais envolvendo plantas medicinais, devido em parte à sua viabilidade econômica, a acessibilidade, a experiência ancestral e eficácia percebida (PALLA, GILANI, 2015).

Por sua vez, a constipação é um problema comum que é muitas vezes associada a outros sintomas, incluindo defecação dolorosa, inchaço e dor abdominal (BIELEFELDT; LEVINHAL; NUSRAT, 2016). A constipação é caracterizada quando o paciente relata dificuldades para evacuar, fezes duras, urgência sem a evacuação, baixa frequência de evacuações, menos de 3 evacuações por semana e a sensação de evacuação incompleta (BIELEFELDT; LEVINHAL; NUSRAT, 2016). É relatado que vários fatores podem levar à constipação intestinal, sem que haja uma explicação. Os que possuem essa desordem com mais frequência são os idosos, o que pode ser associado a menor ingestão alimentar, perda de mobilidade, e fraqueza nas musculaturas abdominais e pélvicas (DANTAS, 2004).

Outras causas são associadas à constipação intestinal, como a falta de resíduos dentro do cólon, a perda de sensibilidade dos órgãos responsáveis pelos mecanismos de defecação e/ou alguma obstrução mecânica. Para o diagnóstico da constipação intestinal é requerido mais tempo quando comparado com a diarreia, pois esse é um sintoma frequente e muitas vezes associados a alterações funcionais de comportamento (BIELEFELDT; LEVINHAL; NUSRAT, 2016).

Algumas doenças são citadas por causar a constipação, como o distúrbio motor associado por diminuição da motilidade enterocólica; distúrbios metabólicos, como em miopatias e neuropatias; e distúrbios mecânicos por oclusão intestinal. A incidência é três vezes maior nos homens obesos, e duas vezes maior nas mulheres obesas, do que na população com peso normal. No entanto, independente da origem, a diminuição na motilidade intestinal é o principal fator desencadeante da constipação (LOCKE; PEMBERTON, PHILLIPS, 2005).

Segundo o Instituto Nacional de Diabetes e Doenças Digestivas e Renais (2014) o tratamento para a constipação vai depender da origem da desordem, no quão incômoda está a situação e em quanto tempo o paciente encontra-se nesse estado.

Inicialmente o tratamento não farmacológico é a primeira escolha, onde se inclui a modificação alimentar, sendo indicado o consumo de pelo menos 25 g de fibras e de 1,5-2,0 L de água por dia, além da prática de exercícios físicos regularmente, visando aumentar a frequência de evacuação sem que haja a necessidade do uso de laxantes.

Quando a mudança no estilo de vida não é suficiente para tratar a constipação do paciente, recomenda-se o tratamento farmacológico, que consiste na utilização de algumas classes de fármacos como, por exemplo, os formadores do bolo fecal, osmóticos, surfactantes, estimulantes ou irritantes da mucosa intestinal e os procinéticos que, de maneira geral, favorecem a expulsão do bolo fecal (WGO, 2010; BRUTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012).

O tratamento da diarreia e da constipação pode ser realizado por meio da medicina tradicional. Algumas espécies vegetais são utilizadas nesse intuito, a exemplo da *Psidium guajava* (“goiabeira”), *Stachytarpheta cayenensis* (“gervão”), *Eugenia uniflora* (“pitangueira”), entre outras, que são utilizadas como antidiarreicas (ALMEIDA et al., 1995); além de *Cassia angustifolia* (“sene”) que possui os glicosídeos senosídeos A e B; e *Rhamnus purshiana* (“Cáscara-sagrada”) onde são encontrados os glicosídeos *barbaloina* e *crisaliina*, que são utilizadas na constipação intestinal. Dessa forma os produtos naturais mostram-se como uma importante fonte de alternativas terapêuticas no tratamento dessas desordens (GALE, 2009).

Visto que há relatos na literatura de produtos naturais de origem marinha que já apresentaram ação sobre a musculatura lisa, podendo citar a alga verde *Cladophora patentiramea* possui atividade vasorrelaxante em aorta de rato (LIM; MOK, 2010); uma toxina de algas vermelhas, a brevetoxina (PbTx), obtida a partir de *Ptychodiscus brevis* apresentou efeito broncoconstrictor em vias aéreas humanas (RICHARDS; BOURGEOIS, 2010); a microalga verde-azulada *Spirulina platensis* que promove alterações na reatividade muscular de aorta e traqueia de rato (BRITO et al., 2015a,b); e o alcaloide indólico caulerpina, componente majoritário de algas do gênero *Caulerpa*, apresentou efeito espasmolítico em íleo de cobaia (CAVALCANTE-SILVA et al., 2013; 2016), é de grande interesse investigar produtos naturais, em especial os de origem marinha em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* em músculo liso intestinal a fim de obter drogas de interesse terapêutico ou utilizadas como futuras ferramentas farmacológicas.

Objetivos

3.1 Geral

Investigar as atividades toxicológica aguda e farmacológica, bem como os possíveis mecanismos de ação do extrato etanólico da esponja *Oceanapia* sp. (OC-EtOH) sobre músculo liso intestinal *in vitro* e *in vivo*, com a finalidade de descobrir drogas potencialmente terapêuticas, ou que sirvam de ferramentas farmacológicas para o melhor entendimento dos processos fisiopatológicos envolvendo a musculatura lisa como, por exemplo, a diarreia ou a constipação.

3.2 Específicos

- ✓ Investigar uma possível atividade do OC-EtOH sobre o músculo liso intestinal de cobaia;
- ✓ Caracterizar, em nível funcional, o mecanismo de ação do OC-EtOH em íleo de cobaia, analisando a participação dos:
 - Receptores muscarínicos;
 - Receptores histaminérgicos;
 - Canais de cálcio dependentes de voltagem;
- ✓ Avaliar a toxicidade aguda do OC-EtOH em camundongos;
- ✓ Estudar um possível efeito do OC-EtOH sobre o trânsito intestinal em camundongos.

4 Material e métodos

4.1 MATERIAL

4.1.1 Produto-teste

Para a realização deste trabalho foi utilizado o extrato etanólico obtido da esponja *Oceanapia sp.* (OC-EtOH) cedido pela Profa. Dra. Bárbara Viviana de Oliveira Santos do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPgPNSB) do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). A esponja *Oceanapia sp.* foi coletada pela PETROBRAS (Petróleo do Brasil S/A), em maio de 2011, na Bacia Potiguar/Rio Grande do Norte (04° 44.8945' S / 036° 25.4571' W), com profundidade de 108 m, como parte dos Projetos: Rede Interinstitucional de Algas Bentônica e INCT em Ambientes Marinhos Tropicais - AmbTropic (CNPq nº 610013/2011-4) e identificadas pelo Prof. Dr. Ulisses dos Santos Pinheiro da Universidade Federal do Pernambuco com o número de tombo UFPEPOR 1551.

O material após coletado foi lavado em água corrente e separada de epífitas. Em seguida foram liofilizadas e pesadas. Posteriormente, cerca de 2 kg do material liofilizado foi triturado e extraído exaustivamente com etanol, filtrado a vácuo com papel de filtro em uma camada de celite em funil de Buchner. A solução extrativa foi posteriormente seca em rotaevaporador obtendo-se 10 g de material, fornecendo um rendimento de 0,5%.

4.1.2 Animais

Para a realização dos protocolos experimentais foram utilizados um total de 45 cobaias (*Cavia porcellus*) e 132 camundongos Swiss (*Mus musculus*) de ambos os sexos, pesando $370,5 \pm 6,1$ e $31,8 \pm 0,4$ g, respectivamente, todos provenientes do Biotério Prof. Thomas George do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) da UFPB. Antes dos experimentos os animais eram mantidos sob controle alimentar a base de ração (Presence®) com livre acesso a água, ventilação e temperatura (22 ± 1 °C) controladas e constantes. Todos os experimentos eram realizados no período de 8 as 20 horas. Os procedimentos experimentais foram

submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)/UFPB (Certidão nº 146/2015, Anexo 1).

4.1.3 Substâncias e reagentes

O cloreto de cálcio di-hidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), o sulfato de magnésio hepta-hidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), o bicarbonato de sódio (NaHCO_3), o cloreto de sódio (NaCl), o cloreto de potássio (KCl), a glicose e o fosfato de sódio monobásico anidro (NaH_2PO_4) foram obtidos da VETEC (Brasil). Estas substâncias, exceto a glicose, o NaCl e o NaHCO_3 , eram dissolvidas e diluídas em água destilada para obtenção de cada solução estoque que eram mantidas sob refrigeração de 4-8 °C.

O óleo de rícino foi obtido da Farmax. O cloridrato de carbamilcolina (CCh), cloridrato de verapamil, o óleo de castor (Cremophor®), o S-(-)-1,4-dihydro-2,6-dimethyl-5-nitro-4-[2-(trifluoromethyl)phenyl]-3-pyridinecarboxylic acid methyl ester (S-(-)-Bay K8644), o di-hidrocloridrato de histamina, o maleato de pirilamina e a atropina foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Brasil). Estas substâncias, exceto o Cremophor®, foram dissolvidas e diluídas em água destilada para obtenção de cada solução estoque (10^{-2} M) que foram mantidas de 4-8 °C em refrigerador.

O ácido clorídrico P.A. (HCl) foi obtido da Química Moderna (Brasil), o hidróxido de sódio (NaOH) e o álcool etílico absoluto foram obtidos da Fmaia (Brasil). A mistura carbogênica (95% de O_2 e 5% de CO_2) foi adquirida da White Martins (Brasil).

4.1.4 Soluções nutritivas

O pH das soluções nutritivas, cujas composições estão descritas abaixo, era ajustado para 7,4 com HCl ou NaOH (1 N).

Tabela 1 – Composição da solução de Krebs modificado (SUN; BENISHIN, 1994).

Composição	Concentração (mM)
NaCl	117,0
KCl	4,7
MgSO ₄	1,3
NaH ₂ PO ₄	1,2
CaCl ₂	2,5
NaHCO ₃	25,0
Glicose	11,0

Tabela 2 – Composição da solução de Krebs modificado despolarizante (KCl 70 mM) nominalmente sem cálcio.

Composição	Concentração (mM)
NaCl	52,7
KCl	70
MgSO ₄	1,3
NaH ₂ PO ₄	1,2
NaHCO ₃	25,0
Glicose	11,0

4.1.5 Preparação do OC-EtOH para os ensaios farmacológicos

O OC-EtOH era solubilizado em Cremophor® 3% (v/v) e diluído em água destilada até a concentração de 10 mg/mL (*in vitro*) ou 100 mg/mL (*in vivo*) (soluções-estoque), conservado a 0 °C. No momento da realização dos protocolos experimentais eram diluídas em água destilada de acordo com a necessidade de cada procedimento. As concentrações e as doses eram utilizadas em múltiplos de 3 ou 2, respectivamente, sendo a concentração máxima 2.187 µg/mL e a dose máxima de 1000 mg/kg. A concentração final de Cremophor® nas cubas nunca excedeu 0,01% (v/v), nessa concentração o Cremophor® é desprovido de efeito contrátil ou relaxante no órgão estudado, de acordo com dados obtidos anteriormente.

4.1.6 Equipamentos

Para o registro das contrações isotônicas, os órgãos eram suspensos em cubas de banho para órgãos isolados (5 mL) e conectados a uma alavanca isotônica de inscrição frontal em cilindros esfumaçados de um quimógrafo (DTF, Brasil). A temperatura das cubas era controlada com bombas termostáticas (BANHO-MARIA AVS-BM, Brasil, ou POLYSTAT 12002, Cole-Palmer, EUA).

Enquanto as contrações isométricas eram registradas com os órgãos suspensos em cubas de banho para órgãos isolados (6 mL) modelo BOI-04 e conectados a transdutores de força isométricos modelo TIM 05 acoplados a um amplificador modelo AECAD04F. Este, por sua vez, era conectado a um sistema de aquisição digital com o software AQCAD versão 2.1.6 para aquisição dos dados e ANCAD para análise. O sistema contém uma bomba termostática modelo BT-60 que

controla a temperatura das cubas. Todos os aparelhos foram adquiridos da AVS Projetos (São Paulo, SP, Brasil).

Todas as substâncias eram pesadas em balança analítica modelo AG200 e os animais em balança semianalítica modelo BG4001, ambas da Gehaka (Brasil).

Os valores de pH eram verificados através de um pHmetro digital PG 2000 (GEHAKA, Brasil).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Triagem farmacológica preliminar

4.2.1.1 Efeito do OC-EtOH sobre o tônus basal em íleo isolado de cobaia

Os cobaias eram mantidos em jejum por um período de 18 horas, tendo acesso à água *ad libitum* antes do início dos experimentos. Após este período eram eutanasiados por decapitação em guilhotina. O abdômen era aberto e um segmento do íleo de aproximadamente 15 cm de comprimento era retirado e colocado em uma placa de Petri contendo solução nutritiva de Krebs modificado a 37 °C, em pH de 7,4 e gaseificados com carbogênio (95% de O₂ e 5% de CO₂) (DANIEL; KWAN; JANSSEN 2001).

Após cuidadosa dissecação, o segmento do íleo era seccionado em fragmentos de 2 a 3 cm de comprimento, suspensos individualmente em cubas de banho para órgãos isolados e deixados em repouso por 30 minutos, tempo necessário para a perfeita estabilização da preparação, durante esse período a solução nutritiva era trocada a cada 15 minutos. Em seguida, era induzida uma contração com 40 mM de KCl para verificar a funcionalidade do órgão. A preparação era lavada e após 15 minutos OC-EtOH era adicionado e observado o seu efeito, logo após era induzida uma curva cumulativa concentração-resposta ao OC-EtOH.

Os resultados foram avaliados pela percentagem da amplitude da resposta contrátil do OC-EtOH. Os valores da concentração do extrato capaz de produzir 50% de seu efeito máximo (CE₅₀) foram calculados por regressão não linear.

4.2.1.2 Efeito do OC-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por KCl, por histamina ou por CCh

O íleo era preparado como descrito anteriormente. Após o período de estabilização, era induzida uma contração com 40 mM de KCl para verificar a funcionalidade do órgão. A preparação era lavada e após 15 minutos, era induzida uma contração com 40 mM de KCl, 10^{-5} M de CCh ou 10^{-6} M de histamina e durante a fase tônica sustentada (8–10 min) dessa concentração, o OC-EtOH era adicionado de maneira cumulativa (0,1-2.187 µg/mL).

O relaxamento produzido pelo OC-EtOH foi expresso como a percentagem reversa da contração induzida pelos agentes contráteis. Os valores de CE_{50} foram calculados por regressão não linear.

4.2.2 Investigação do mecanismo de ação espasmogênica do OC-EtOH em íleo isolado de cobaia

4.2.2.1 Avaliação da participação dos receptores muscarínicos no efeito espasmogênico do OC-EtOH na ausência e na presença de atropina

O íleo era preparado como descrito no item 4.2.1.1. Após o período de estabilização, era induzida uma contração com 40 mM de KCl para verificar a funcionalidade do órgão em seguida a preparação era lavada e após 15 minutos eram induzidas duas curvas concentrações-resposta cumulativas similares ao CCh (controle positivo) ou ao OC-EtOH. Em seguida, na ausência do CCh ou do extrato, a atropina (antagonista dos receptores muscarínicos) era incubada por 15 minutos nas concentrações de 10^{-9} e 3×10^{-8} M e em experimentos independentes (BASHIR et al., 2006). Após este período, na presença da atropina, uma nova curva concentração-resposta cumulativa ao CCh ou ao OC-EtOH era obtida.

Os resultados foram avaliados comparando-se a percentagem da resposta contrátil na presença da atropina com aquela obtida pela média das amplitudes máximas das curvas-controle (ausência). O efeito inibitório da atropina foi avaliado com base na análise dos valores de CE_{50} e do efeito máximo (E_{max}) do CCh ou do OC-

EtOH, calculados a partir das curvas concentrações-resposta, na ausência e na presença de atropina.

4.2.2.2 Avaliação da participação dos receptores histaminérgicos no efeito espasmogênico do OC-EtOH na ausência e na presença de pirilamina

O íleo era preparado como descrito no item 4.2.1.1. Após o período de estabilização, era induzida uma contração com 40 mM de KCl para verificar a funcionalidade do órgão e após 15 minutos eram induzidas duas curvas concentrações-resposta cumulativas similares à histamina (controle positivo) e com o OC-EtOH. Em seguida, na ausência do extrato, a pirilamina (antagonista dos receptores histaminérgicos) era incubada por 30 minutos nas concentrações de 10^{-9} a 3×10^{-7} M e em experimentos independentes (GHAYUR; GILANI, 2005). Após este período, na presença da pirilamina, uma nova curva concentração-resposta cumulativa à histamina e ao OC-EtOH era obtida.

Os resultados foram avaliados comparando-se a percentagem da resposta contrátil na presença da pirilamina com aquela obtida pela média das amplitudes máximas das curvas-controle (ausência). O efeito inibitório da pirilamina foi avaliado com base na análise dos valores de CE_{50} e do E_{max} da histamina e do OC-EtOH calculados a partir das curvas concentrações-resposta, na ausência e na presença de pirilamina.

4.2.2.3 Avaliação da participação dos Cav no efeito espasmogênico do OC-EtOH na ausência e na presença de verapamil

O íleo era preparado como descrito no item 4.2.1.1. Após o período de estabilização, era induzida uma contração com 40 mM de KCl para verificar a funcionalidade do órgão, em seguida a preparação era lavada e após 15 minutos era induzida uma contração com 729 μ g/mL do OC-EtOH e sobre o componente tônico era adicionado 3×10^{-6} M de verapamil. Em seguida, em experimentos diferentes, duas curvas concentrações-resposta cumulativas similares ao OC-EtOH (0,1-2.187 μ g/mL) eram obtidas. Na ausência do extrato, o verapamil (bloqueador dos Cav) era incubado por 15 minutos nas concentrações de 10^{-7} a 10^{-6} M e em

experimentos independentes (STANEVA-STOYTCHIEVA; VENKOVA, 1992). Após este período, na presença do verapamil, uma nova curva concentração-resposta cumulativa ao OC-EtOH era obtida.

Os resultados foram avaliados comparando-se a percentagem da resposta contrátil na presença e na ausência do verapamil. O efeito inibitório do verapamil foi avaliado com base na análise dos valores de CE_{50} e do E_{max} do OC-EtOH calculados a partir das curvas concentrações-resposta, na ausência e na presença do verapamil.

4.2.3 Investigação do mecanismo de ação espasmolítica do OC-EtOH em íleo isolado de cobaia

4.2.3.1 Efeito do extrato OC-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por KCl na presença de pirilamina

O íleo era preparado como descrito no item 4.2.1.1. Após o período de estabilização, era induzida uma contração com 40 mM de KCl para verificar a funcionalidade do órgão, após 15 min era induzida uma contração com 40 mM de KCl para verificar a funcionalidade do órgão. A preparação era lavada e após 15 minutos, era pré-incubada a pirilamina (antagonista dos receptores histaminérgicos) (GHAYUR; GILANI, 2005) por 30 min e em seguida era induzida uma contração com 40 mM de KCl e durante a fase tônica sustentada (8–10 min) o OC-EtOH era adicionado de maneira cumulativa (0,1-729 $\mu\text{g/mL}$).

O relaxamento produzido pelo OC-EtOH foi expresso como a percentagem reversa da contração produzida pelo agente contrátil. Os valores de CE_{50} foram calculados por regressão não linear.

4.2.3.2 Avaliação da participação dos Ca_v no efeito espasmolítico do OC-EtOH

4.2.3.2.1 Efeito do OC-EtOH frente às contrações induzidas por CaCl_2 em meio despolarizante nominalmente sem Ca^{2+}

O íleo era preparado como descrito no item 4.2.1.1. Após um período de estabilização do órgão por 30 minutos, a solução de Krebs modificado era substituída

pela solução despolarizante (KCl 70 mM) nominalmente sem Ca^{2+} durante um período de 45 minutos. Eram induzidas duas curvas concentrações-resposta cumulativas similares ao CaCl_2 (VAN ROSSUM, 1963). Em seguida, o OC-EtOH era incubado por 15 minutos e após esse período, uma terceira curva cumulativa ao CaCl_2 era obtida na presença do OC-EtOH em experimentos diferentes.

Os resultados foram avaliados comparando-se a percentagem da resposta contrátil na presença do OC-EtOH com aquela obtida pela amplitude média das curvas-controle. O efeito inibitório foi avaliado com base na análise dos valores de CE_{50} e de E_{max} do CaCl_2 calculados a partir das curvas concentrações-resposta, na ausência e presença do extrato.

4.2.3.2.2 Efeito do OC-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por S-(-)-Bay K8644

O íleo era preparado como descrito no item 4.2.1.1. Após estabilização por 30 minutos em solução de Krebs modificado, era adicionada a pirilamina, um antagonista dos receptores H_1 , por 30 minutos, para a retirada do componente espasmogênico, em seguida o íleo era parcialmente despolarizado pela adição de 15 mM de KCl por 10 minutos e, então, era induzida uma contração com 3×10^{-7} M de S-(-)-Bay K8644 (CONTE-CAMERINO et al., 1987), um agonista seletivo dos $\text{Cav}1$ (FERRANTE et al., 1989).

Durante a fase tônica dessa contração, o verapamil (controle positivo) ou o OC-EtOH (0,1-729 $\mu\text{g/mL}$) eram adicionado de maneira cumulativa. O relaxamento foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial produzida pelo S-(-)-Bay K8644 e o valor de CE_{50} foi calculado por regressão não linear.

4.2.4 Triagem farmacológica comportamental e avaliação da toxicidade aguda do OC-EtOH em camundongos

Para avaliação da toxicidade aguda, seguiu-se a metodologia descrita pela Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) nº 423/2001 (OECD, 2001). Eram utilizadas 3 fêmeas, que após jejum de 4 horas, eram tratadas com OC-EtOH (dose única de 2000 mg/kg) por via oral (v.o.) ou salina 0,9% +

Cremophor® (controle, v.o.). Os animais eram ainda avaliados durante 14 dias com a finalidade de verificar se houve alguma morte e assim estimar a dose do extrato que mata 50% dos animais testados (DL₅₀).

Após a administração do OC-EtOH, uma série de parâmetros comportamentais eram observados durante as 4 primeiras horas, por exemplo: hiperatividade, agressividade, tremores, convulsão, piloereção, sedação, ataxia, catatonia, analgesia, perda do reflexo corneal e auricular, dispneia, ambulação, escalagem, contorções abdominais, hemorragia, automutilação e vômitos (Adaptado de Almeida et al., 1999) (Anexo 2). A evolução ponderal dos animais também foi avaliada antes do tratamento, 7 dias e 14 dias após o tratamento.

4.2.5 Avaliação do efeito do OC-EtOH sobre o trânsito intestinal em camundongos

Os camundongos em jejum de 12 horas eram divididos em 3 grupos de 6 animais cada, e tratados (v.o.) com solução salina (10 mL/kg) mais Cremophor® (controle negativo), 2 mg/kg de atropina (controle positivo) e o OC-EtOH (várias doses). Decorridos 30 minutos, era administrado 0,01 mL, para cada grama de animal, de carvão ativado (5%), o marcador, suspenso em carboxi-metil-celulose (0,5%). Os animais eram eutanasiados por deslocamento cervical, 30 minutos após a administração do carvão ativado. Em seguida a cavidade abdominal era aberta e o intestino delgado removido. Era determinado, com o auxílio de uma régua, o comprimento total do intestino delgado (distância compreendida entre o piloro até a válvula ileocecal) de cada animal e a distância percorrida pelo carvão na ausência (RAO et al., 1997) e na presença do óleo de rícino (30 minutos antes da administração do carvão ativado). Os resultados foram expressos como a percentagem da distância percorrida pelo marcador em relação ao comprimento total do intestino. Os valores do E_{max} e da dose do extrato capaz de produzir 50% de seu efeito máximo (DE₅₀) foram expressos como a percentagem da média e o erro padrão da média (e.p.m.) dos seus valores individuais.

4.3 Análise estatística

Todos os resultados obtidos foram expressos como a percentagem da média e o e.p.m. e analisados estatisticamente empregando-se o teste “t” ou análise de variância (ANOVA) “one-way” seguido do pós-teste de Bonferroni. A hipótese nula foi rejeitada quando $p < 0,05$. Os valores de CE₅₀ e de DE₅₀ foram calculados por regressão não linear e usados como parâmetros de potência, enquanto o E_{max} foi utilizado como parâmetro de eficácia. Todos os dados foram analisados pelo programa GraphPad Prism® versão 5.01.

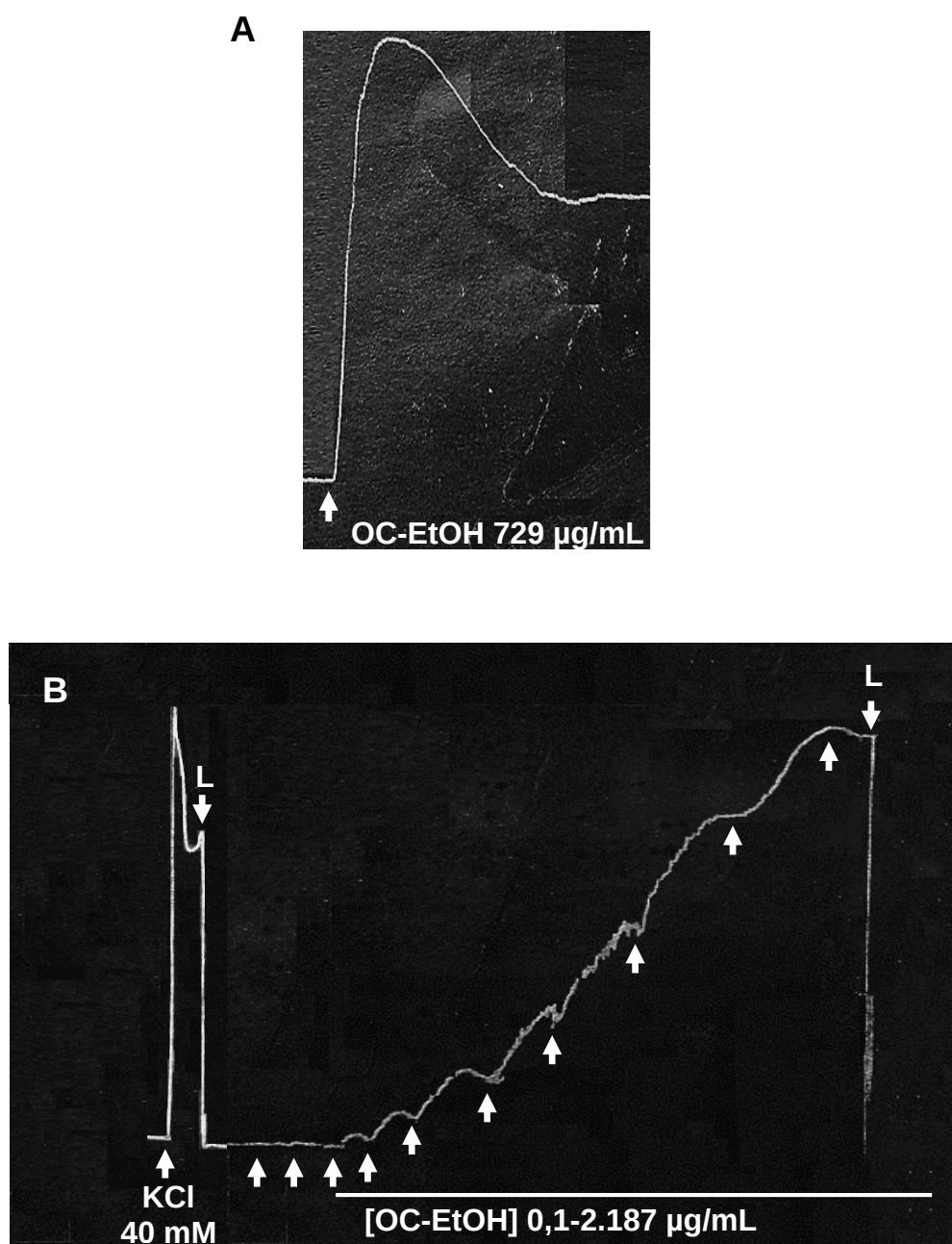
5 Resultados

5.1 Triagem farmacológica preliminar

5.1.1 Efeito do OC-EtOH sobre o tônus basal em íleo isolado de cobaia

O OC-EtOH (0,1-2.187 $\mu\text{g/mL}$, $n = 5$), adicionado cumulativamente sobre o tônus basal do íleo de cobaia, contraiu o íleo de cobaia de maneira dependente de concentração ($\text{CE}_{50} = 48,6 \pm 2,7 \mu\text{g/mL}$), com amplitude semelhante à contração prévia induzida por 40 mM de KCl (Figura 7). O efeito contrátil máximo (E_{max}) do extrato foi observado na concentração de 729 $\mu\text{g/mL}$ (Gráfico 1). A resposta contrátil foi abolida logo após a retirada do OC-EtOH da preparação.

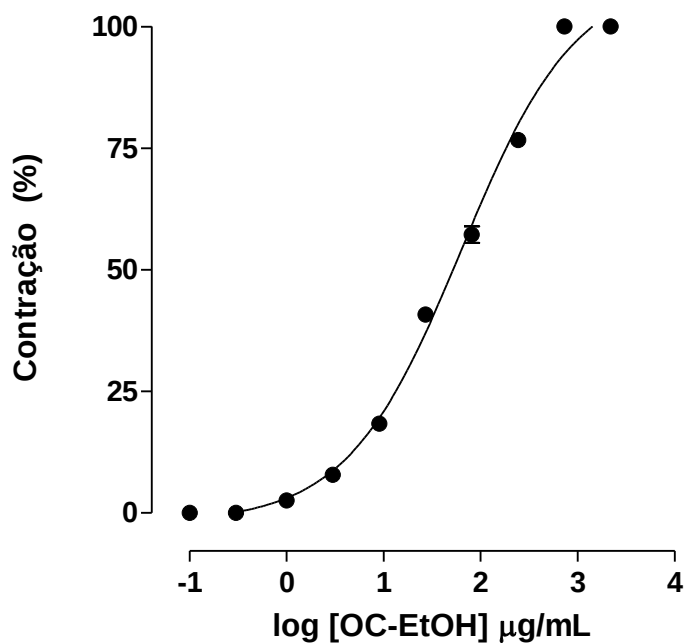
Figura 7 – Registro representativo do efeito contrátil (A) e cumulativo (B) do OC-EtOH sobre o tônus basal em íleo isolado de cobaia.



As setas para cima representam a concentração de 0,1; 0,3; 1; 3; 9; 27; 81; 243; 729 e 2.187 µg/mL do OC-EtOH, respectivamente. L = Lavagem

Fonte: Pereira, 2016.

Gráfico 1 – Curva concentração-resposta cumulativa ao OC-EtOH (●) sobre o tônus basal em íleo isolado de cobaia.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5).

Fonte: Pereira, 2016.

5.1.2 Efeito do OC-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por KCl, por histamina ou por CCh

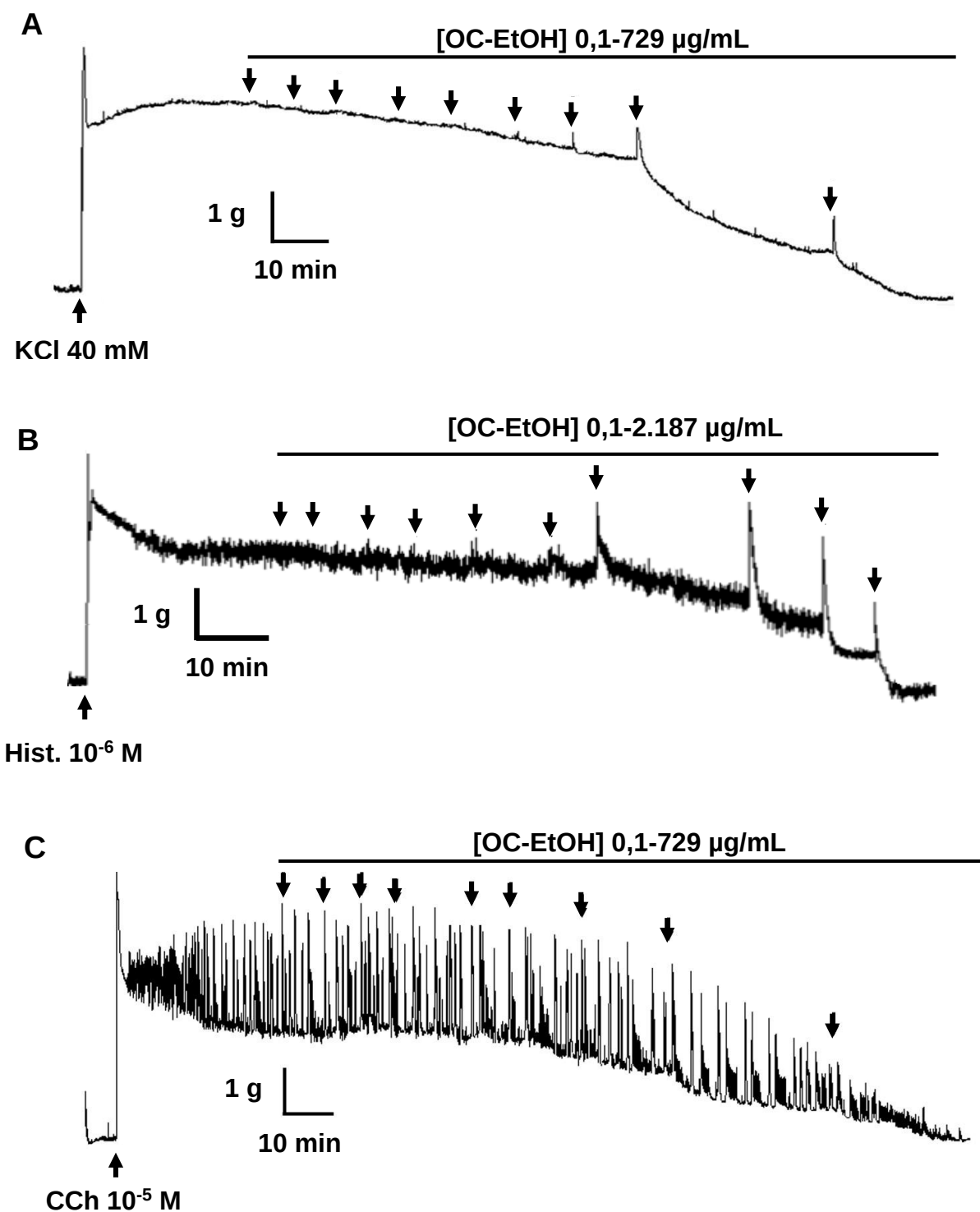
Quando o íleo de cobaia era pré-contraído com 40 mM de KCl e com 10^{-6} M de histamina, o OC-EtOH (0,1–2.187 $\mu\text{g/mL}$, $n = 5$) induziu um efeito contrátil transiente (espasmogênico) seguido de um relaxamento (espasmolítico), ambos de maneira dependente de concentração (Figura 8). A contração transiente induzida pelo extrato nas concentrações de 27, 81, 243 e 729 $\mu\text{g/mL}$ foram de 0,0; $24,2 \pm 7,1$; $83,1 \pm 6,9$ e $99,8 \pm 0,1\%$, respectivamente, em relação ao componente tônico induzido pelo KCl e $12,4 \pm 2,2$; $59,8 \pm 10,7$; $86,5 \pm 7,9$ e $88,1 \pm 5,8\%$, respectivamente, em relação à histamina. A potência espasmogênica do OC-EtOH foi cerca de 2 vezes maior quando a contração era induzida por histamina ($\text{CE}_{50} = 73,5 \pm 6,9 \mu\text{g/mL}$) do que por KCl ($\text{CE}_{50} = 176,6 \pm 32,6 \mu\text{g/mL}$).

Diferentemente, sobre o componente tônico da contração induzida por 10^{-5} M de CCh, o extrato (0,1–729 $\mu\text{g/mL}$, $n = 5$) apresentou apenas um efeito relaxante e dependente de concentração (Figura 8, Gráfico 2).

Analisando a potência espasmolítica do OC-EtOH, pode ser observado que extrato foi equipotente em relaxar o íleo de cobaia pré-contraído tanto com por KCl ($\text{CE}_{50} = 103,9 \pm 8,6 \mu\text{g/mL}$), como por histamina ($\text{CE}_{50} = 90,1 \pm 9,2 \mu\text{g/mL}$) e por CCh ($\text{CE}_{50} = 97,1 \pm 17,4 \mu\text{g/mL}$). Os valores de E_{max} espasmolítico (100%) do OC-EtOH foram atingidos na concentração de 729 $\mu\text{g/mL}$ para o órgão contraído com KCl e CCh. Já quando o mesmo era pré-contraído com histamina esse E_{max} só foi alcançado na concentração de 2.187 $\mu\text{g/mL}$ (Gráfico 3, Tabela 3).

Os tempos de relaxamento foram de $113,0 \pm 4,3$; de $106,0 \pm 4,3$ e de $121,0 \pm 3,3$ minutos para KCl, histamina e CCh, respectivamente, enquanto que a responsividade do íleo ao KCl, à histamina e ao CCh foi revertida em $57,0 \pm 5,6$; $54,0 \pm 6,0$ e $60,0 \pm 4,7$ minutos, respectivamente, após a remoção do OC-EtOH das preparações (dados não mostrados).

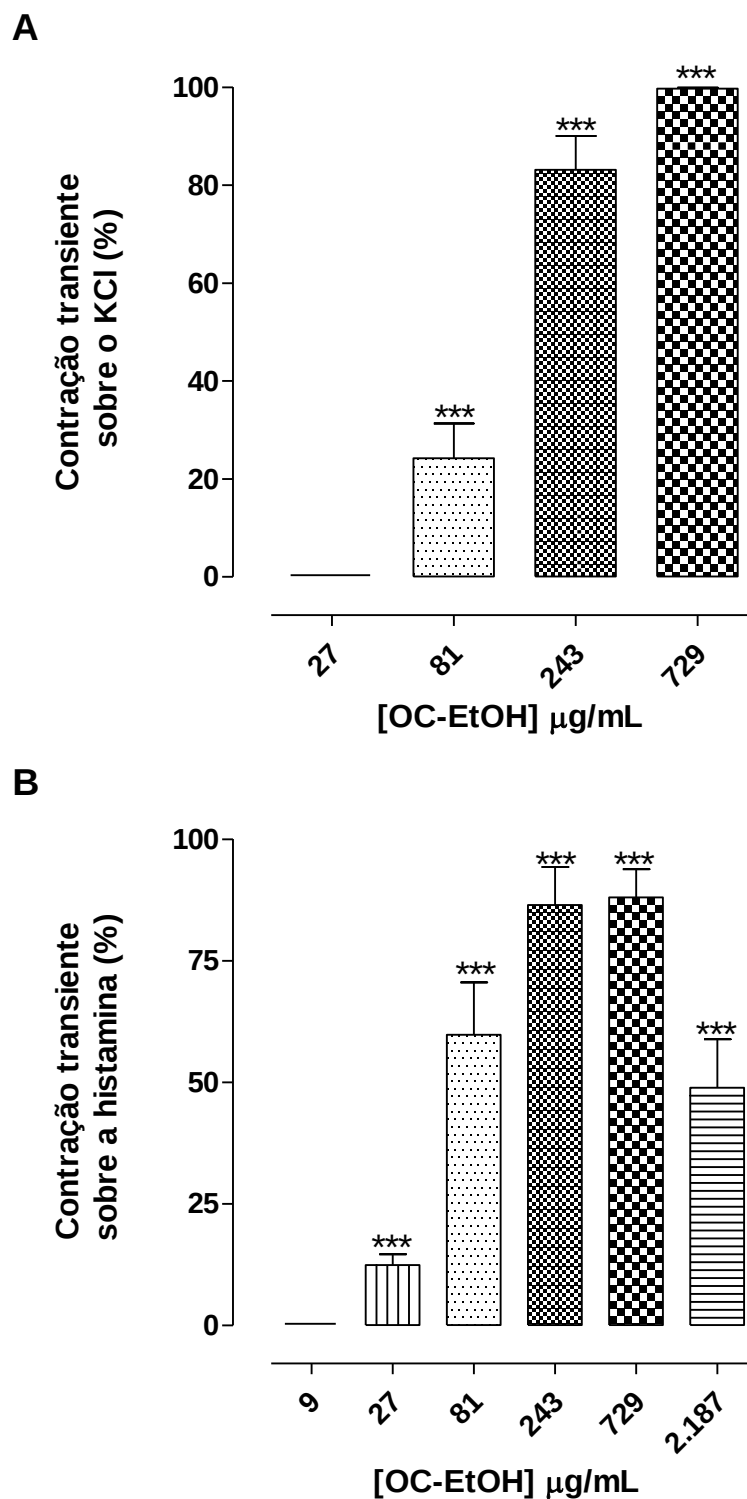
Figura 8 – Registros representativos do efeito dual do OC-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por 40 mM de KCl (**A**), por 10^{-6} M de histamina (**B**) e por 10^{-5} M de CCh (**C**) em íleo isolado de cobaia.



As setas para baixo representam as concentrações cumulativas de 0,1; 0,3; 1; 3; 9; 27, 81, 243 e 729 $\mu\text{g/mL}$ (**A** e **C**) e 0,1; 0,3; 1; 3; 9; 27, 81, 243, 729 e 2.187 $\mu\text{g/mL}$ (**B**) do OC-EtOH, respectivamente. CCh = carbacol; Hist. = histamina.

Fonte: Pereira, 2016.

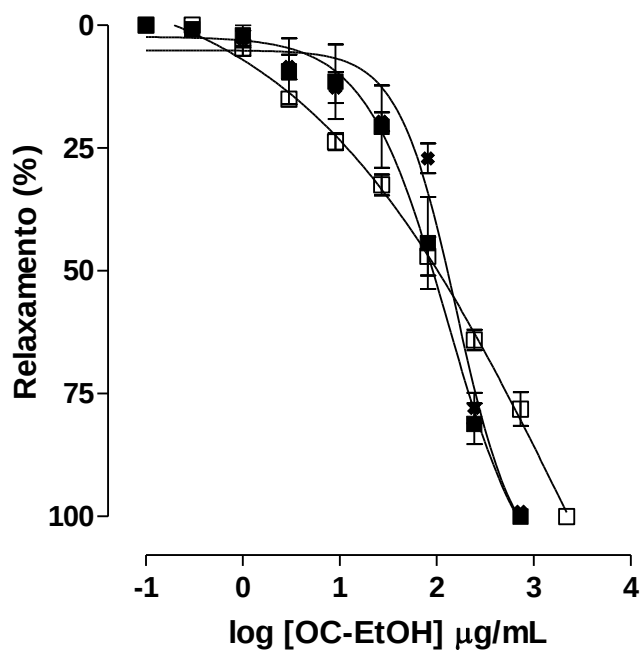
Gráfico 2 – Efeito contrátil do OC-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por 40 mM de KCl (**A**) e por 10^{-6} M de histamina (**B**) em íleo isolado de cobaia.



As colunas e as barras verticais representam a percentagem da média e o e.p.m., respectivamente ($n = 5$). ANOVA “one-way” seguido seguido do pós-teste de Bonferroni: *** $p < 0,001$ (9 vs. 27, 81, 243, 729 e 2.187 µg/mL do OC-EtOH).

Fonte: Pereira, 2016.

Gráfico 3 – Efeito do OC-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por 40 mM de KCl (✱), por 10^{-6} M de histamina (□) e por 10^{-5} M de CCh (■) em íleo isolado de cobaia.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5).

Fonte: Pereira, 2016.

Tabela 3 – Valores de $E_{\max}$ (%) e de CE_{50} (μg/mL) do OC-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por 40 mM de KCl, por 10^{-5} M de CCh ou por 10^{-6} M histamina em íleo isolado de cobaia.

Agentes contráteis	$E_{\max}$ (%)	CE_{50} (μg/mL)
KCl	100	$103,9 \pm 8,6$
CCh	100	$97,1 \pm 17,4$
Histamina	100	$90,1 \pm 9,2$

ANOVA “one-way” seguido do pós-teste de Bonferroni (n = 5).

Fonte: Pereira, 2016.

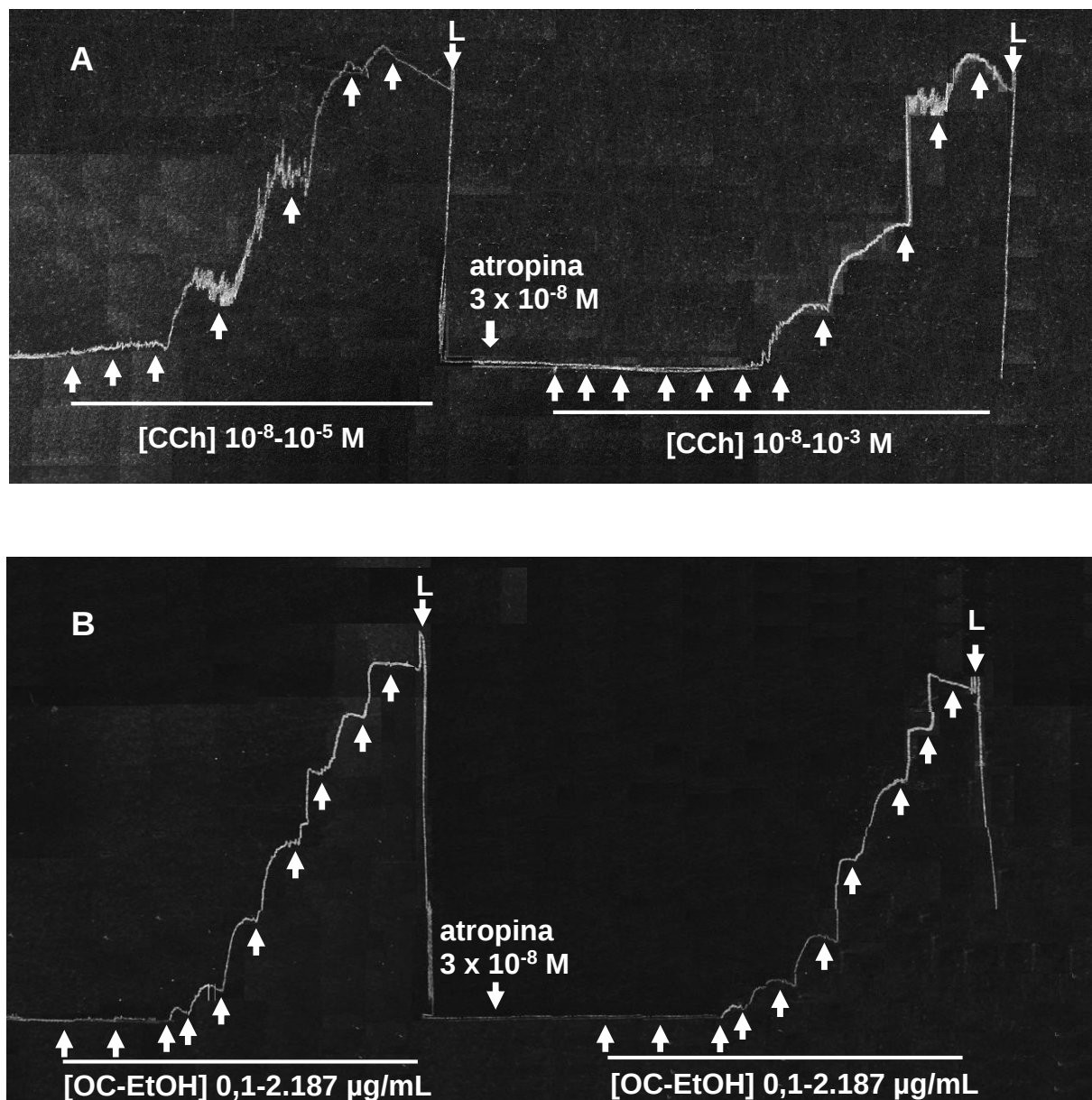
5.2 Investigação do mecanismo de ação espasmogênica do OC-EtOH em íleo isolado de cobaia

5.2.1 Avaliação da participação dos receptores muscarínicos no efeito espasmogênico do OC-EtOH na ausência e na presença de atropina

Na presença de atropina, antagonista não seletivo dos receptores muscarínicos (fármaco padrão – controle positivo), a curva cumulativa de contração induzida por CCh (10^{-8} – 3×10^{-5} M, $n = 5$) foi deslocada para a direita de maneira paralela, não havendo redução do $E_{\max}$. Os valores de CE_{50} para o CCh foram de $1,9 \pm 0,1 \times 10^{-7}$ M na ausência e de $2,4 \pm 0,2 \times 10^{-7}$; $1,5 \pm 0,07 \times 10^{-6}$; $5,3 \pm 0,4 \times 10^{-6}$ e $2,3 \pm 0,04 \times 10^{-5}$ M na presença de 10^{-9} ; 3×10^{-9} ; 10^{-8} e 3×10^{-8} M de atropina, respectivamente (Figura 9A, Gráfico 4A, Tabela 5). Na ausência e na presença de 10^{-9} M de atropina o $E_{\max}$ (100%) do CCh foi atingido na concentração de 10^{-5} M, enquanto que na presença de 3×10^{-9} , 10^{-8} e 3×10^{-8} M de atropina, esse efeito só foi atingido nas concentrações de 10^{-4} , 3×10^{-4} e 10^{-3} M, respectivamente.

Diferentemente, a curva cumulativa de contração do OC-EtOH ($CE_{50} = 48,6 \pm 2,7$ $\mu\text{g/mL}$, $n = 5$), na presença de atropina (10^{-8} e 3×10^{-8} M) não foi deslocada ($CE_{50} = 43,3 \pm 2,6$ e $41,4 \pm 3,8$ $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, $n = 5$) (Figura 9B, Gráfico 4B) nem houve alteração nos $E_{\max}$.

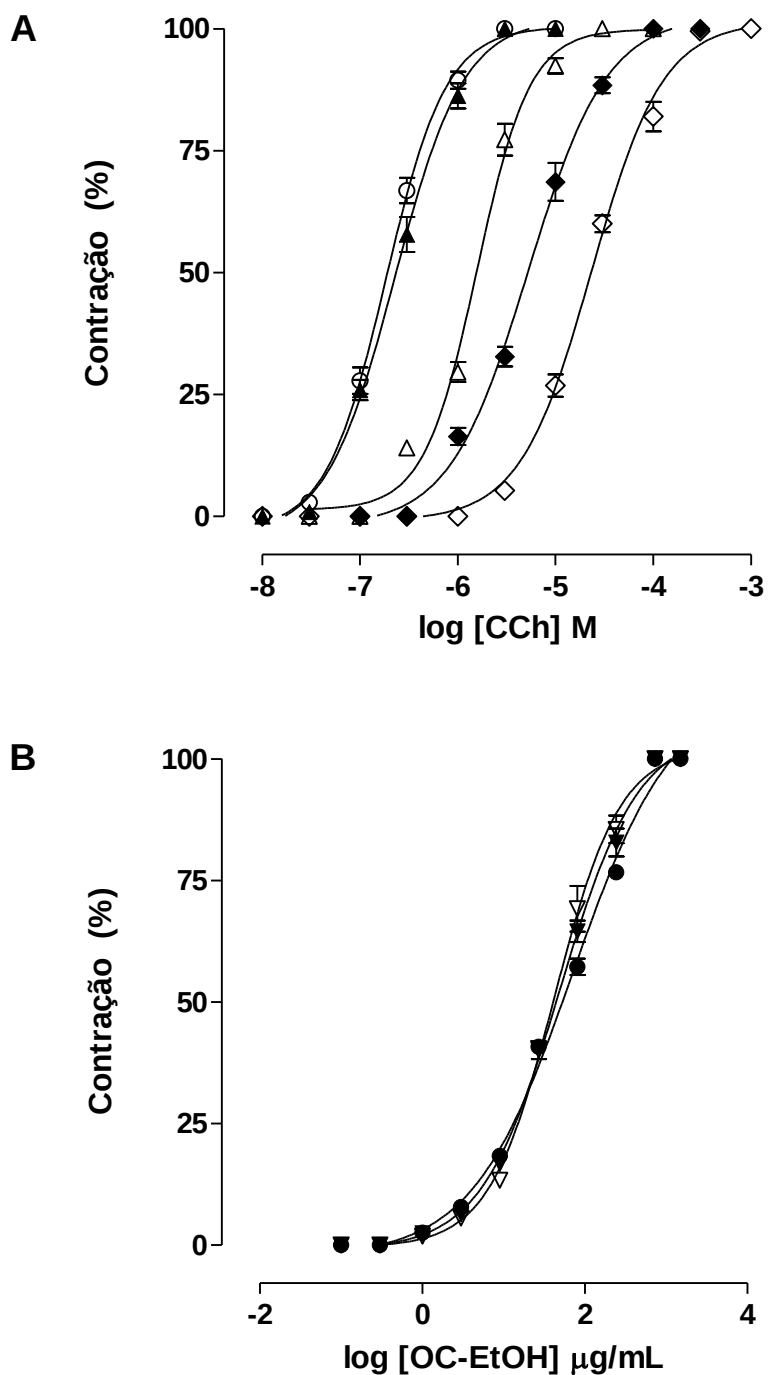
Figura 9 – Registros representativos das curvas concentrações-resposta cumulativas ao CCh (A) e ao OC-EtOH (B) na ausência e na presença de 3×10^{-8} M de atropina em íleo isolado de cobaia.



As setas para cima representam as concentrações de 10^{-8} ; 3×10^{-8} ; 10^{-7} ; 3×10^{-7} ; 10^{-6} ; 3×10^{-6} ; 10^{-5} ; 3×10^{-5} ; 10^{-4} ; 3×10^{-4} e 10^{-3} M de CCh (A); 0,1; 0,3; 1; 3; 9; 27; 81; 243; 729 e 2.187 $\mu\text{g/mL}$ do OC-EtOH (B), respectivamente. L = Lavagem.

Fonte: Pereira, 2016.

Gráfico 4 – Curvas concentrações-resposta cumulativas ao CCh (**A**) e ao OC-EtOH (**B**) na ausência (○, ●) e na presença de 10^{-9} (▲), 3×10^{-9} (△), 10^{-8} (◆, ▼) e 3×10^{-8} M (◇, ▽) de atropina em íleo isolado de cobaia.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5).

Fonte: Pereira, 2016.

Tabela 4 – Valores de $E_{\max}$ (%) e de CE_{50} (M) do CCh na ausência e na presença de atropina em íleo isolado de cobaia.

Atropina (M)	$E_{\max}$ (%)	CE_{50} (M)
Ausência	100	$1,9 \pm 0,1 \times 10^{-7}$
10^{-9}	100	$2,4 \pm 0,2 \times 10^{-7}$
3×10^{-9}	100	$1,5 \pm 0,07 \times 10^{-6} ***$
10^{-8}	100	$5,3 \pm 0,4 \times 10^{-6} ***$
3×10^{-8}	100	$2,3 \pm 0,04 \times 10^{-5} ***$

ANOVA “one-way” seguido do pós-teste de Bonferroni: $***p < 0,001$ (Ausência vs. atropina) (n = 5).

Fonte: Pereira, 2016.

Tabela 5 – Valores de $E_{\max}$ (%) e de CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$) do OC-EtOH na ausência e na presença de atropina em íleo isolado de cobaia.

Atropina (M)	$E_{\max}$ (%)	CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Ausência	100	$48,6 \pm 2,7$
10^{-8}	100	$43,3 \pm 2,6$
3×10^{-8}	100	$41,4 \pm 3,8$

ANOVA “one-way” seguido do pós-teste de Bonferroni (n = 5).

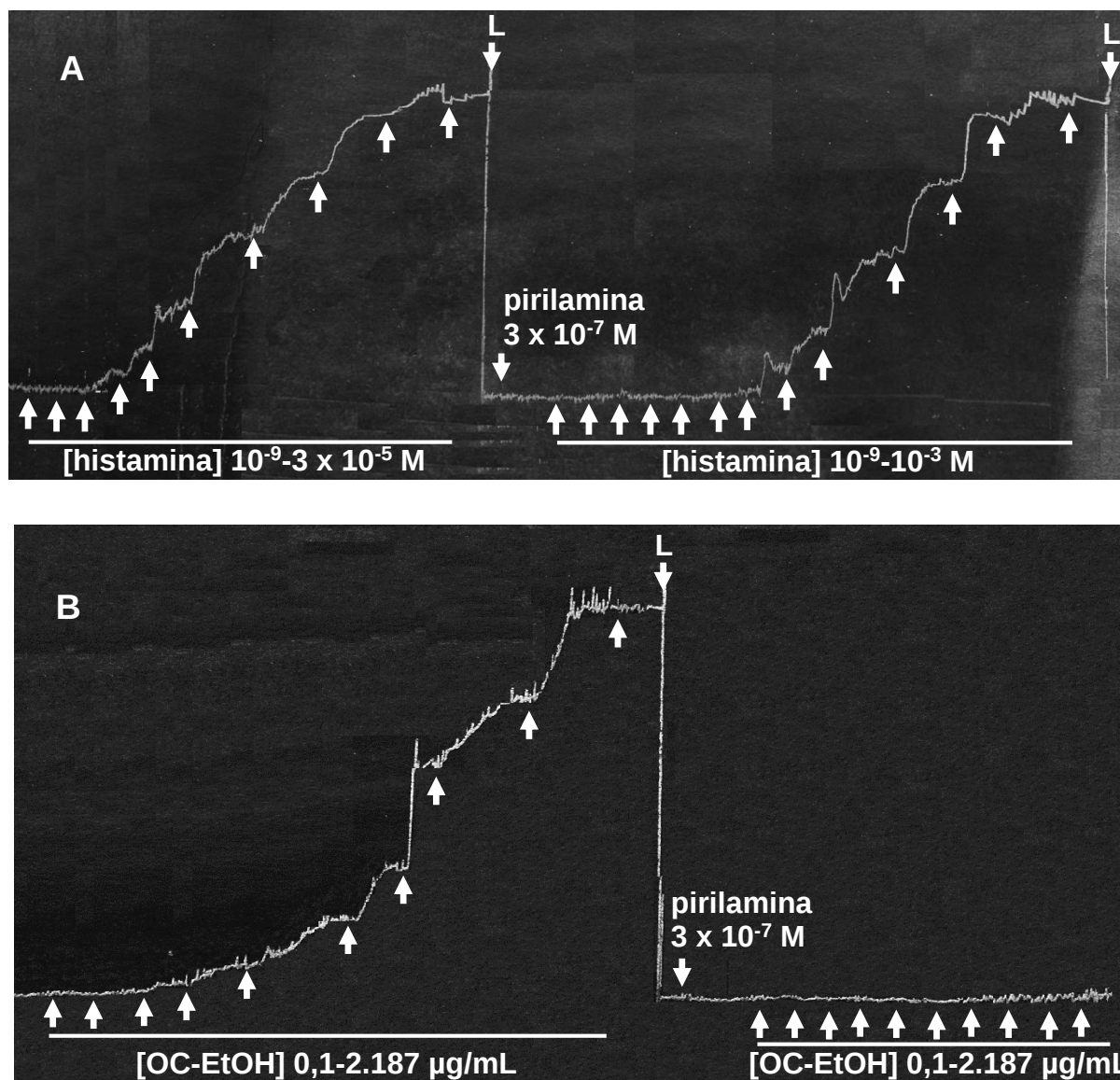
Fonte: Pereira, 2016.

5.2.2 Avaliação da participação dos receptores histaminérgicos no efeito espasmogênico do OC-EtOH na ausência e na presença de pirilamina

Na presença de pirilamina (controle positivo), um antagonista dos receptores histaminérgicos H_1 , a curva cumulativa de contração induzida por histamina (10^{-9} - 10^{-3} M, $n = 5$) foi deslocada para a direita de maneira paralela não havendo redução do E_{max} . Os valores de CE_{50} para a histamina foram de $2,3 \pm 0,2 \times 10^{-7}$ M na ausência e de $2,5 \pm 0,3 \times 10^{-7}$; $3,9 \pm 0,3 \times 10^{-7}$; $8,3 \pm 0,3 \times 10^{-7}$; $5,0 \pm 0,2 \times 10^{-6}$; $9,5 \pm 0,2 \times 10^{-6}$ e $3,1 \pm 0,3 \times 10^{-5}$ M na presença de 10^{-9} ; 3×10^{-9} ; 10^{-8} ; 3×10^{-8} ; 10^{-7} e 3×10^{-7} M de pirilamina, respectivamente (Figura 10A, Gráfico 5A, Tabela 6). Na ausência e na presença de 10^{-9} e 3×10^{-9} M de pirilamina o E_{max} (100%) da histamina foi atingido na concentração de 3×10^{-5} M, enquanto que na presença de 10^{-8} ; 3×10^{-8} ; 10^{-7} e 3×10^{-7} M de pirilamina, esse efeito só foi atingido nas concentrações de 10^{-4} ; 3×10^{-4} ; 3×10^{-4} e 10^{-3} M, respectivamente, $n = 5$.

Diferentemente, as contrações cumulativas induzidas pelo OC-EtOH na presença de pirilamina (10^{-9} – 3×10^{-7} M), foram inibidas e desviadas para direita de forma não paralela e com redução do E_{max} de 100% (controle) para $96,7 \pm 1,1$; $81,4 \pm 3,6$; $61,3 \pm 2,8$; $35,5 \pm 2,1$; $19,7 \pm 2,7$ e 0%, respectivamente. Os valores de CE_{50} do OC-EtOH passaram de $48,6 \pm 2,7$ μ g/mL (controle) para $41,3 \pm 3,2$; $88,6 \pm 10$; $131,2 \pm 11$ e $255,2 \pm 25,7$ μ g/mL, nas concentrações de 10^{-9} , 3×10^{-9} , 10^{-8} , 3×10^{-8} e 10^{-7} M, respectivamente, de pirilamina ($n = 5$). Para a concentração de 3×10^{-7} M não foi possível calcular a CE_{50} (Figura 10B, Gráfico 5B, Tabela 7).

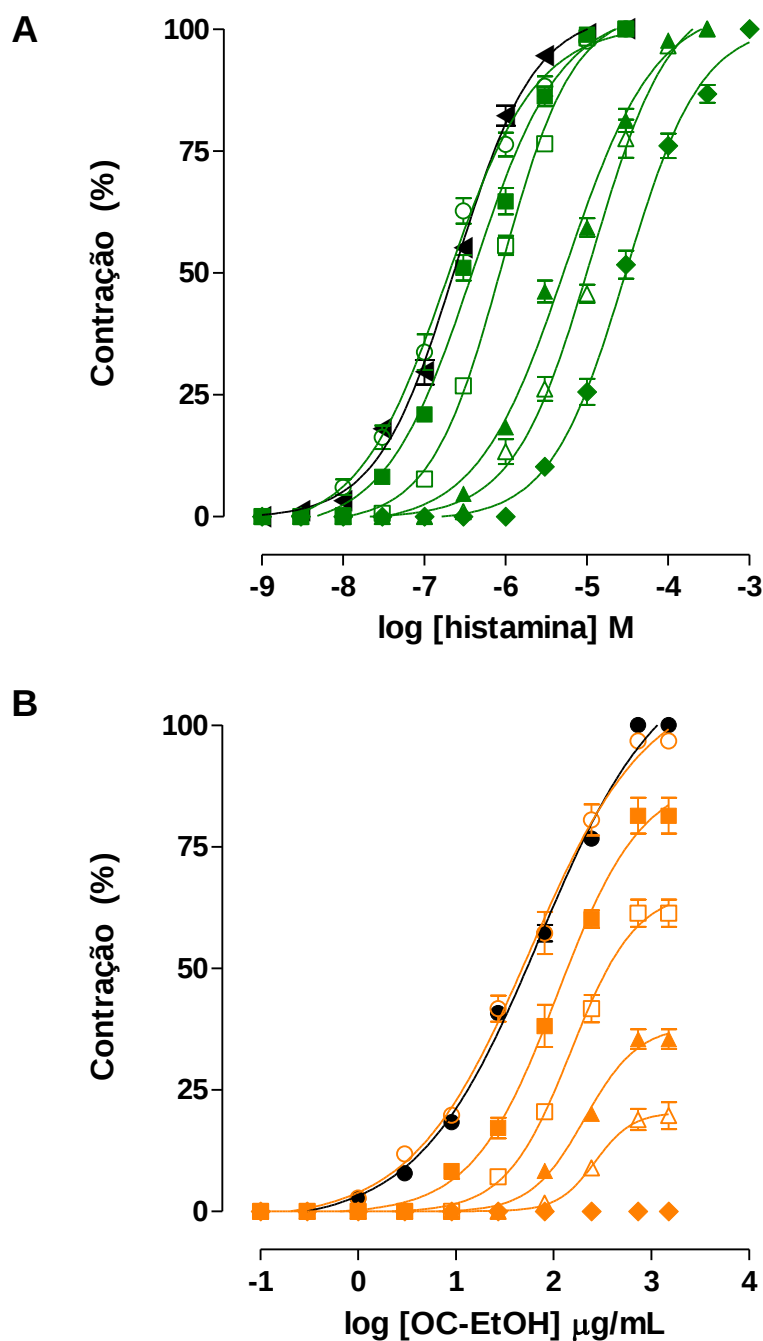
Figura 10 – Registros representativos das curvas concentrações-resposta cumulativas à histamina (A) e ao OC-EtOH (B) na ausência e na presença de 3×10^{-7} M de pirilamina em íleo isolado de cobaia.



As setas para cima representam as concentrações de 10^{-9} ; 3×10^{-9} ; 10^{-8} ; 3×10^{-8} ; 10^{-7} ; 3×10^{-7} ; 10^{-6} ; 3×10^{-6} ; 10^{-5} ; 3×10^{-5} ; 10^{-4} ; 3×10^{-4} e 10^{-3} M de histamina (A); 0,1; 0,3; 1; 3; 9; 27; 81; 243; 729 e 2.187 μ g/mL do OC-EtOH (B), respectivamente. L = Lavagem.

Fonte: Pereira, 2016.

Gráfico 5 – Curvas concentrações-resposta cumulativas à histamina (A) e ao OC-EtOH (B) na ausência (◀, ●) e na presença de 10^{-9} (○, ○), 3×10^{-9} (■, ■), 10^{-8} (□, □), 3×10^{-8} (▲, ▲), 10^{-7} (△, △) e 3×10^{-7} M (◆, ◆) de pirilamina, em íleo isolado de cobaia.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente ($n = 5$).

Fonte: Pereira, 2016.

Tabela 6 – Valores de $E_{\max}$ (%) e de CE_{50} (M) da histamina na ausência e na presença de pirilamina em íleo isolado de cobaia.

Pirilamina (M)	$E_{\max}$ (%)	CE_{50} (M)
Ausência	100	$2,3 \pm 0,2 \times 10^{-7}$
10^{-9}	100	$2,5 \pm 0,3 \times 10^{-7}$
3×10^{-9}	100	$3,9 \pm 0,3 \times 10^{-7} **$
10^{-8}	100	$8,3 \pm 0,3 \times 10^{-7} ***$
3×10^{-8}	100	$5,0 \pm 0,2 \times 10^{-6} ***$
10^{-7}	100	$9,5 \pm 0,2 \times 10^{-6} ***$
3×10^{-7}	100	$3,1 \pm 0,3 \times 10^{-5} ***$

ANOVA “one-way” seguido do pós-teste de Bonferroni: $**p < 0,01$ e $***p < 0,001$ (Ausência vs. pirilamina) (n = 5).

Fonte: Pereira, 2016.

Tabela 7 – Valores de $E_{\max}$ (%) e de CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$) do OC-EtOH na ausência e na presença de pirilamina em íleo isolado de cobaia.

Pirilamina (M)	$E_{\max}$ (%)	CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Ausência	100	$48,6 \pm 2,7$
10^{-9}	$96,7 \pm 1,1$	$41,3 \pm 3,2$
3×10^{-9}	$81,4 \pm 3,6 ***$	$88,6 \pm 10 ***$
10^{-8}	$61,3 \pm 2,8 ***$	$131,2 \pm 11 ***$
3×10^{-8}	$35,5 \pm 2,1 ***$	$184,5 \pm 12,6 ***$
10^{-7}	$19,7 \pm 2,7 ***$	$255,2 \pm 25,7 ***$
3×10^{-7}	0 ***	Nd

ANOVA “one-way” seguido do pós-teste de Bonferroni: $***p < 0,001$ (Ausência vs. pirilamina); Nd = não determinado (n = 5).

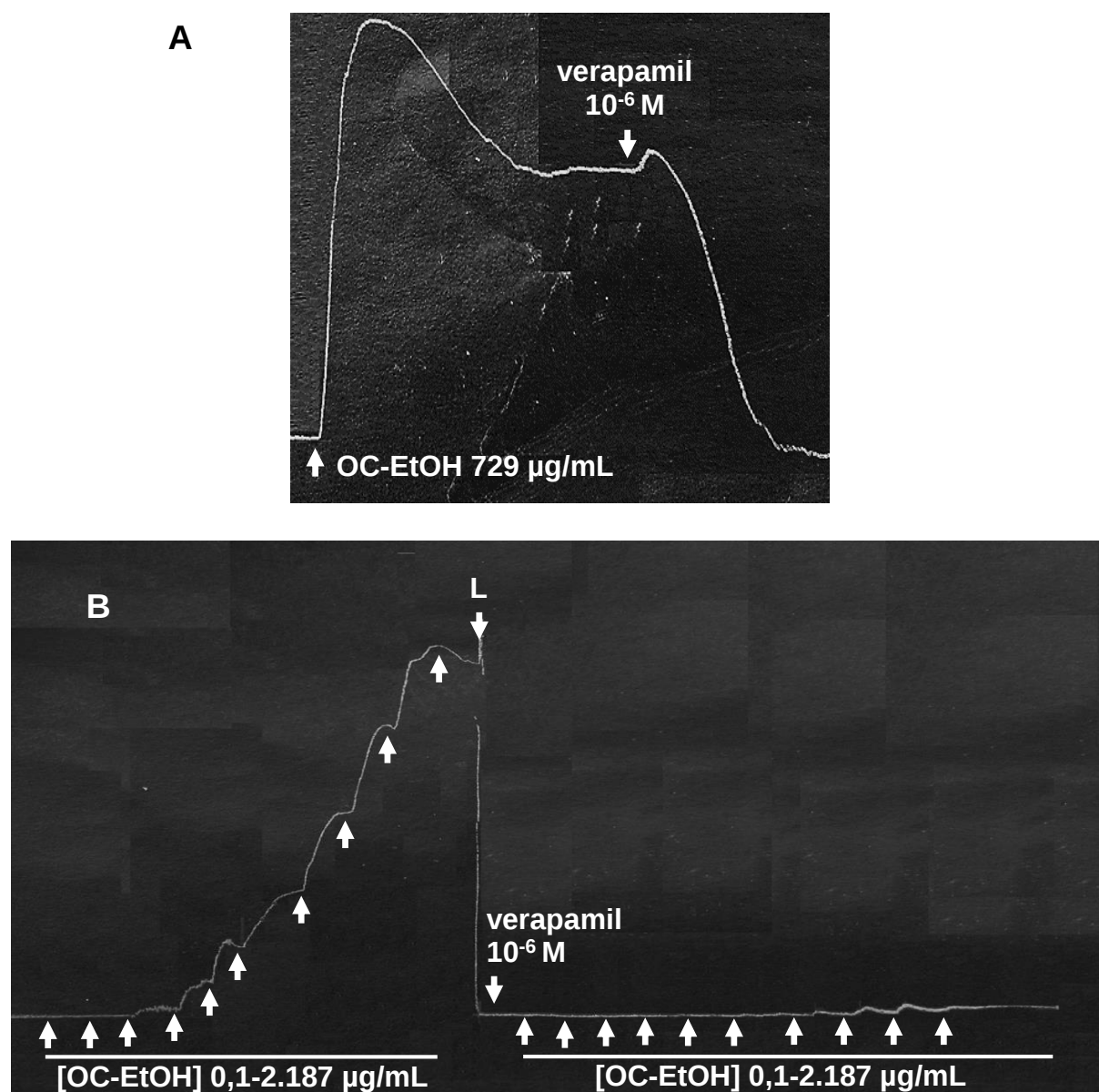
Fonte: Pereira, 2016.

5.2.3 Avaliação da participação dos Cav no efeito espasmogênico do OC-EtOH na ausência e na presença de verapamil

O verapamil na concentração de 10^{-6} M induziu um relaxamento no íleo de cobaia pré-contraído com 729 $\mu\text{g/mL}$ do OC-EtOH (Figura 11A). Em seguida, observou-se que na presença de 10^{-7} , 3×10^{-7} e 10^{-6} M de verapamil a curva cumulativa de contração induzida pelo extrato ($\text{CE}_{50} = 48,6 \pm 2,7 \mu\text{g/mL}$, $n = 5$) foi inibida, havendo abolição da resposta contrátil do OC-EtOH.

Ao comparar-se os valores de CE_{50} do OC-EtOH observou-se que não houve diferença entre a curva-controle ($\text{CE}_{50} = 48,6 \pm 2,7 \mu\text{g/mL}$, $n = 5$) e aquelas obtidas na presença de 10^{-7} e 3×10^{-7} M de verapamil ($\text{CE}_{50} = 55,9 \pm 5,3$ e $51,8 \pm 3,7 \mu\text{g/mL}$, respectivamente, $n = 5$). Para a concentração de 10^{-6} M não foi possível calcular a CE_{50} . (Figura 11B, Gráfico 6, Tabela 8). Analisando os valores de E_{max} , pode-se observar que na presença de 10^{-7} e 3×10^{-7} e 10^{-6} M de verapamil o efeito passou de 100% (controle) para $90,0 \pm 1,2$; $53,2 \pm 3,2$ e $4,9 \pm 1,3\%$, respectivamente.

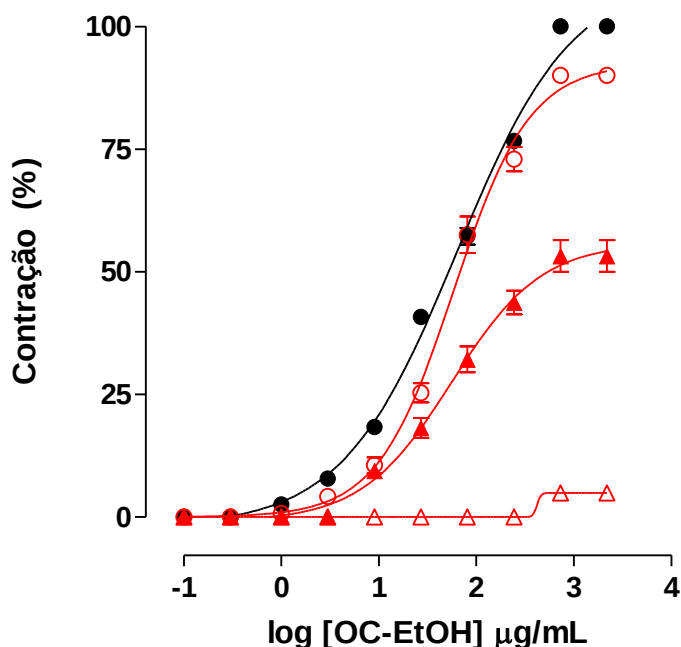
Figura 11 – Registros representativos do efeito espasmolítico de 10^{-6} M de verapamil sobre a contração tônica induzida por OC-EtOH (A) e das curvas concentrações-resposta cumulativas ao OC-EtOH na ausência e na presença de 10^{-6} M de verapamil (B) em íleo isolado de cobaia.



As setas para cima representam a concentração de 729 µg/mL (A) e de 0,1; 0,3; 1; 3; 9; 27, 81, 243; 729 e 2.187 µg/mL, respectivamente do OC-EtOH (B). L = Lavagem.

Fonte: Pereira, 2016.

Gráfico 6 – Curvas concentrações-resposta cumulativas ao OC-EtOH na ausência (●) e na presença de verapamil nas concentrações de 10^{-7} (○), 3×10^{-7} (▲) e 10^{-6} M (△), em íleo isolado de cobaia.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5).

Fonte: Pereira, 2016.

Tabela 8 – Valores de $E_{\max}$ (%) e de CE_{50} (µg/mL) do OC-EtOH na ausência e na presença de verapamil em íleo isolado de cobaia.

Verapamil (M)	$E_{\max}$ (%)	CE_{50} (µg/mL)
Ausência	100	$48,6 \pm 2,7$
10^{-7}	$90,0 \pm 1,2^{**}$	$55,9 \pm 5,3$
3×10^{-7}	$53,2 \pm 3,2^{***}$	$51,8 \pm 3,7$
10^{-6}	$4,9 \pm 1,3^{***}$	Nd

ANOVA “one-way” seguido do pós-teste de Bonferroni: $^{**}p < 0,01$ e $^{***}p < 0,001$ (Ausência vs. verapamil). Nd = não determinado (n = 5).

Fonte: Pereira, 2016.

5.3 Investigação do mecanismo de ação espasmolítica do OC-EtOH em íleo isolado de cobaia

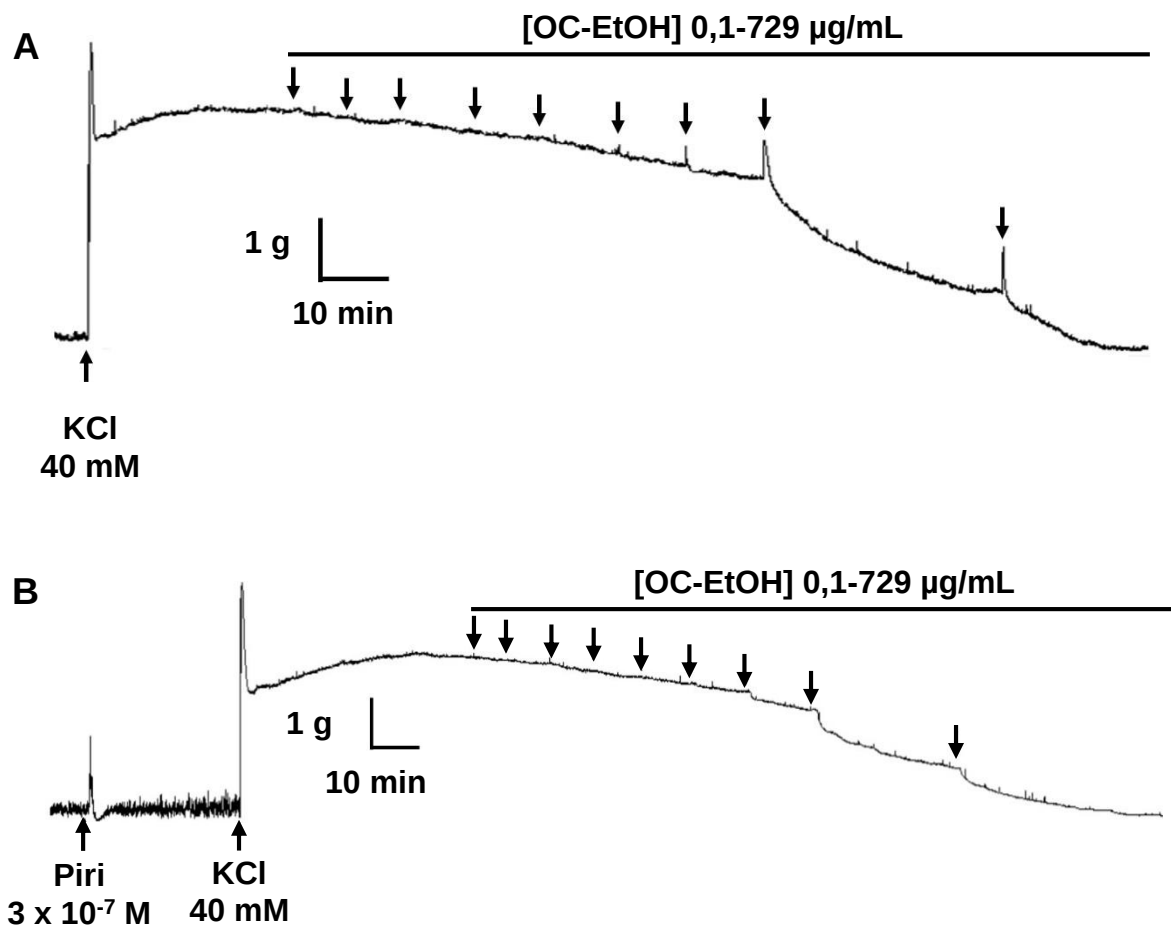
5.3.1 Efeito do extrato OC-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por KCl na presença de pirilamina

Na presença de pirilamina (3×10^{-7} M), um antagonista dos receptores H_1 , o efeito contrátil transiente do OC-EtOH sobre o componente tônico da contração induzida por KCl foi abolido (Figura 12). Interessantemente, o efeito espasmolítico do extrato na presença de pirilamina foi potencializado (Figura 12, Gráfico 7, Tabela 9).

Analisando os valores de CE_{50} observou-se que o OC-EtOH foi cerca de 2 vezes mais potente em relaxar o órgão pré-contraído com KCl na presença de 3×10^{-7} M de pirilamina ($CE_{50} = 62,9 \pm 9,9 \mu\text{g/mL}$, $n = 5$), do que na ausência desse antagonista ($CE_{50} = 103,9 \pm 8,6 \mu\text{g/mL}$, $n = 5$).

Os tempos de relaxamento foram de $113,0 \pm 4,3$; e de $144,0 \pm 8,6$ minutos para KCl e pirilamina + KCl, respectivamente, enquanto que a responsividade do íleo ao KCl foi revertida em $57,0 \pm 5,6$ e na presença da pirilamina foi de $60,0 \pm 8,6$ minutos, após a remoção do OC-EtOH das preparações (dados não mostrados).

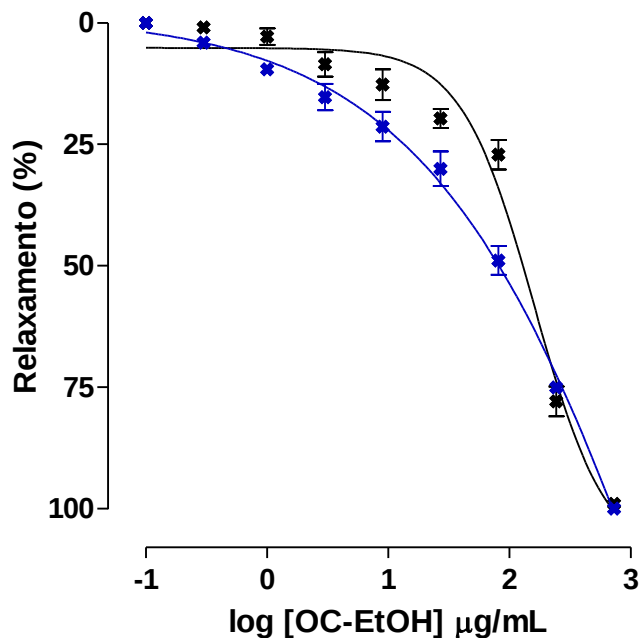
Figura 12 – Registros representativos do efeito espasmolítico do OC-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por 40 mM de KCl na ausência (A) e na presença de pirilamina (B) em íleo isolado de cobaia.



As setas para baixo representam as concentrações cumulativas de 0,1; 0,3; 1; 3; 9; 27; 81, 243 e 729 µg/mL do OC-EtOH, respectivamente. Piri = pirilamina;

Fonte: Pereira, 2016.

Gráfico 7 – Efeito do OC-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por 40 mM de KCl na ausência (✕) e na presença de 10^{-6} M de pirilamina (✱) em íleo isolado de cobaia.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5).

Fonte: Pereira, 2016.

Tabela 9 – Valores de $E_{\max}$ (%) e de CE_{50} (µg/mL) do OC-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por 40 mM de KCl na ausência e na presença de pirilamina em íleo isolado de cobaia.

Agente contrátil	$E_{\max}$ (%)	CE_{50} (µg/mL)
KCl	100	$103,9 \pm 8,6$
Pirilamina + KCl	100	$62,9 \pm 9,9^*$

Teste t; $*p < 0,05$ (KCl vs. pirilamina + KCl) (n = 5).

Fonte: Pereira, 2016.

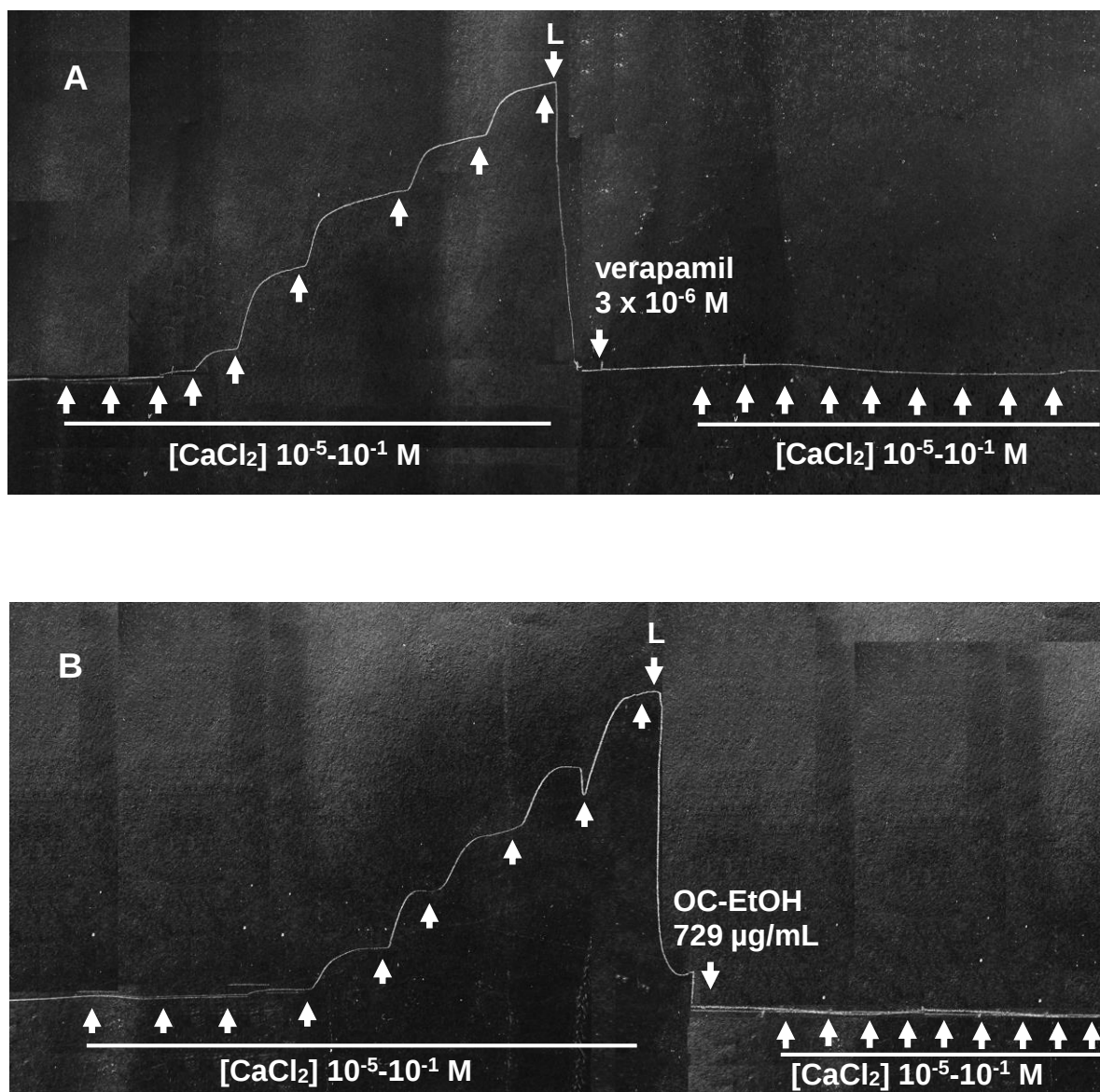
5.3.2 Avaliação da participação dos Cav no efeito espasmolítico do OC-EtOH

5.3.2.1 Efeito do OC-EtOH frente às contrações induzidas por CaCl₂ em meio despolarizante nominalmente sem Ca²⁺

O verapamil, um bloqueador dos Cav (controle positivo), nas concentrações de 3×10^{-8} a 3×10^{-6} M inibiu as contrações cumulativas induzidas pelo aumento na concentração extracelular de CaCl₂ (10^{-5} - 10^{-1} M) em meio despolarizante nominalmente sem Ca²⁺ (n = 5). As curvas concentrações-resposta cumulativas ao CaCl₂ foram desviadas para direita de forma não paralela e com redução do E_{max} de 100% (controle) para $80,2 \pm 3,7$; $63,2 \pm 0,9$; $35,6 \pm 2,9$ e 0%, respectivamente. Os valores de CE₅₀ do CaCl₂ passaram de $2,1 \pm 0,3 \times 10^{-3}$ M (controle) para $2,4 \pm 0,2$; $3,5 \pm 0,4$; $7,4 \pm 0,03 \times 10^{-3}$ M e $1,2 \pm 0,01 \times 10^{-2}$ M; respectivamente. Para a concentração de 3×10^{-6} não foi possível calcular a CE₅₀ (Figura 13A, Gráfico 8A, Tabela 10).

De maneira similar, o OC-EtOH (27, 81, 243 e 729 µg/mL, n = 5) inibiu as contrações cumulativas induzidas pelo aumento na concentração extracelular de CaCl₂ em meio despolarizante nominalmente sem Ca²⁺ (n = 5). As curvas concentrações-resposta cumulativas ao CaCl₂ foram desviadas para direita de forma não paralela e com redução do E_{max} de 100% (controle) para $98,5 \pm 0,9$; $69,3 \pm 4,8$; $45,0 \pm 4,4$ e $1,8 \pm 0,5\%$, respectivamente. Os valores de CE₅₀ do CaCl₂ passaram de $2,1 \pm 0,1 \times 10^{-3}$ M (controle) para $2,5 \pm 0,3$; $3,9 \pm 0,7$ e $6,8 \pm 1,4 \times 10^{-3}$ M, respectivamente, para a concentração de 729 não foi possível calcular a CE₅₀ (Figura 13B, Gráfico 8B, Tabela 11).

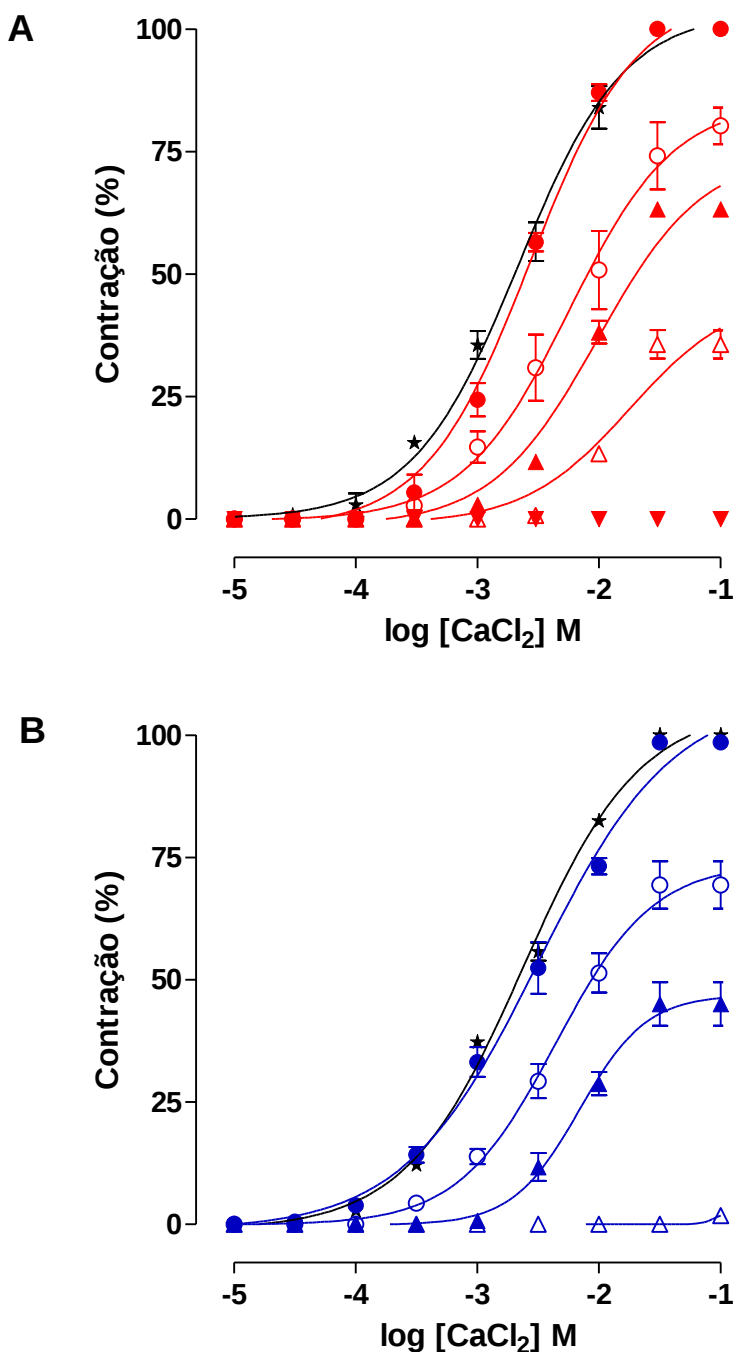
Figura 13 – Registros representativos das curvas concentrações-resposta cumulativas ao CaCl_2 em meio despolarizante nominalmente sem Ca^{2+} na ausência e na presença de 3×10^{-6} M de verapamil (A) ou de 729 $\mu\text{g/mL}$ do OC-EtOH (B) em íleo isolado de cobaia.



As setas para cima representam as concentrações cumulativas de 10^{-5} ; 3×10^{-5} ; 10^{-4} ; 3×10^{-4} ; 10^{-3} ; 3×10^{-3} ; 10^{-2} ; 3×10^{-2} e 10^{-1} M de CaCl_2 , respectivamente. L = Lavagem.

Fonte: Pereira, 2016.

Gráfico 8 – Curvas concentrações-resposta cumulativas ao CaCl_2 em meio despolarizante nominalmente sem Ca^{2+} na ausência ($\star$), na presença de 3×10^{-8} ($\bullet$), 10^{-7} ($\circ$), 3×10^{-7} ($\blacktriangle$), 10^{-6} ($\triangle$) e 3×10^{-6} M ($\blacktriangledown$) de verapamil (A) e na presença de 27 ($\bullet$), 81 ($\circ$), 243 ($\blacktriangle$) e 729 $\mu\text{g/mL}$ ($\triangle$) do OC-EtOH (B), em íleo isolado de cobaia.



Os símbolos e barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente ($n = 5$).

Fonte: Pereira, 2016.

Tabela 10 – Valores de $E_{\max}$ (%) e de CE_{50} (M) do $CaCl_2$ na ausência e na presença de verapamil em óleo isolado de cobaia.

Verapamil (M)	$E_{\max}$ (%)	CE_{50} (M)
Ausência	100	$2,1 \pm 0,3 \times 10^{-3}$
3×10^{-8}	100	$2,4 \pm 0,2 \times 10^{-3}$
10^{-7}	$80,2 \pm 3,7^{***}$	$3,5 \pm 0,4 \times 10^{-3}^{**}$
3×10^{-7}	$63,2 \pm 0,9^{***}$	$7,4 \pm 0,03 \times 10^{-3}^{***}$
10^{-6}	$35,6 \pm 2,9^{***}$	$1,2 \pm 0,01 \times 10^{-2}^{***}$
3×10^{-6}	0^{***}	Nd

ANOVA “one-way” seguido do pós-teste de Bonferroni: $^{**}p < 0,01$ e $^{***}p < 0,001$ (Ausência vs. verapamil). Nd = não determinado (n = 5).

Fonte: Pereira, 2016.

Tabela 11 – Valores de $E_{\max}$ (%) e de CE_{50} (M) do $CaCl_2$ na ausência e na presença de OC-EtOH em óleo isolado de cobaia.

OC-EtOH ($\mu\text{g/mL}$)	$E_{\max}$ (%)	CE_{50} (M)
Ausência	100	$2,1 \pm 0,1 \times 10^{-3}$
27	$98,5 \pm 0,9$	$2,5 \pm 0,3 \times 10^{-3}$
81	$69,3 \pm 4,8^{***}$	$3,9 \pm 0,7 \times 10^{-3}^*$
243	$45,0 \pm 4,4^{***}$	$6,8 \pm 1,4 \times 10^{-3}^*$
729	$1,8 \pm 0,5^{***}$	Nd

ANOVA “one-way” seguido do pós-teste de Bonferroni: $^*p < 0,05$ e $^{***}p < 0,001$ (Ausência vs. OC-EtOH). Nd = não determinado (n = 5).

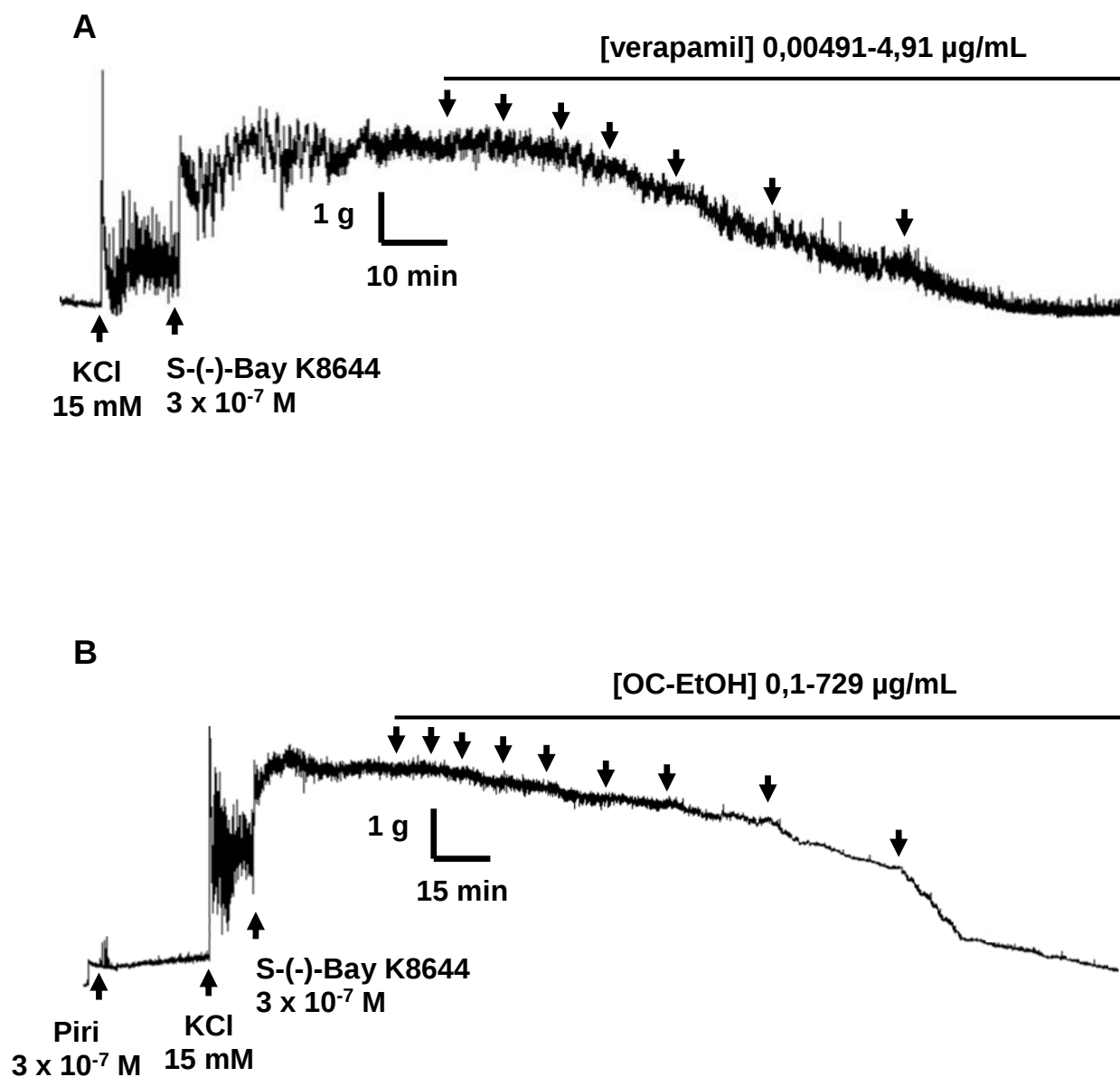
Fonte: Pereira, 2016.

5.3.2.2 Efeito do OC-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por S-(-)-Bay K8644

O verapamil, um bloqueador dos Cav, relaxou o íleo de cobaia pré-contraído com 40 mM de KCl ($CE_{50} = 0,0094 \pm 0,0006 \mu\text{g/mL}$) e com 3×10^{-7} M de S-(-)-Bay K8644, um agonista dos Cav ($CE_{50} = 0,30 \pm 0,02 \mu\text{g/mL}$, $n = 5$), um agonista de Cav1, em meio parcialmente despolarizado com 15 mM de KCl (Figura 14A, Gráfico 9A).

Na presença da pirilamina, o OC-EtOH relaxou o íleo de cobaia pré-contraído com 3×10^{-7} M de S-(-)-Bay K8644 ($CE_{50} = 166,9 \pm 17,8 \mu\text{g/mL}$, $n = 5$) e sua potência relaxante foi reduzida em 2,6 vezes quando comparado ao íleo pré-contraído por 40 mM de KCl ($CE_{50} = 62,9 \pm 9,9 \mu\text{g/mL}$, $n = 5$) (Figura 14B, Gráfico 9B e Tabela 12).

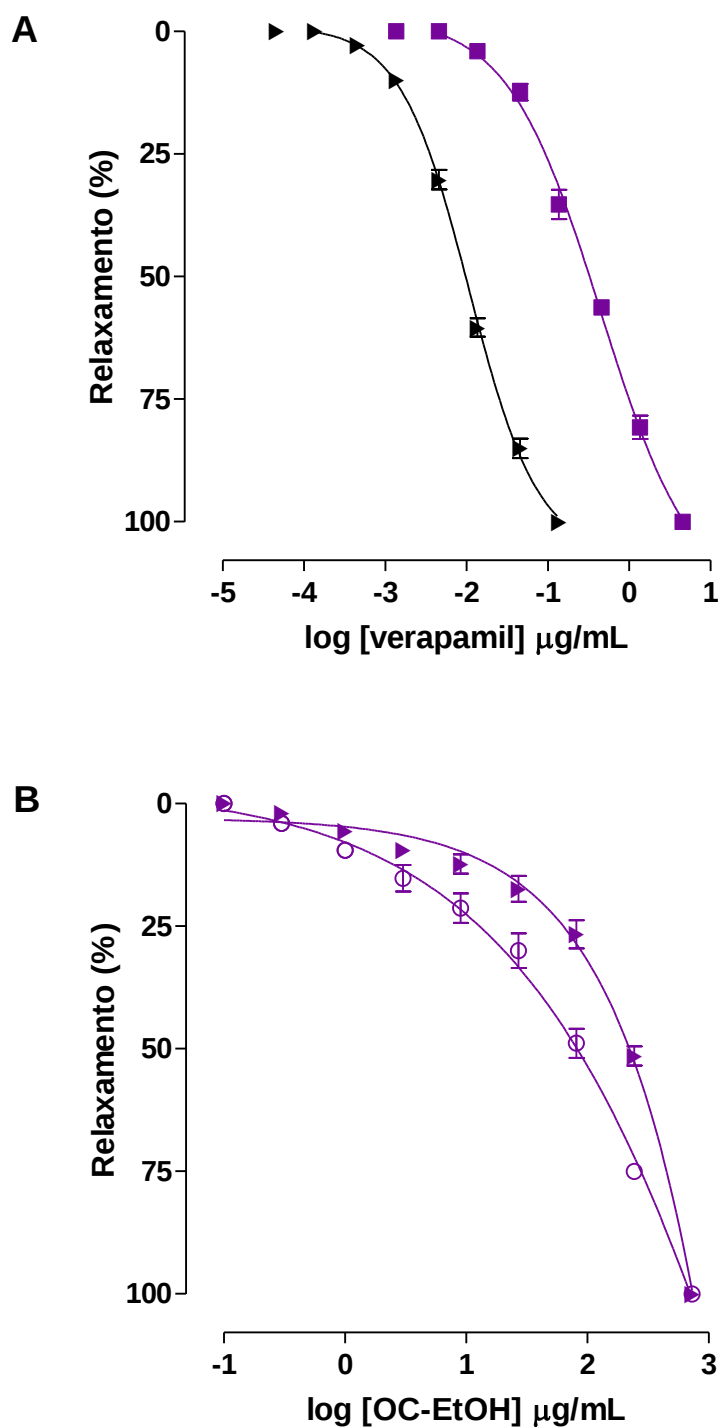
Figura 14 – Registros representativos do efeito espasmolítico de verapamil (A), do OC-EtOH (B) sobre a contração induzida por 3×10^{-7} M de S-(-)-Bay K8644 em íleo isolado de cobaia parcialmente despolarizado com 15 mM de KCl.



As setas para baixo representam as concentrações cumulativas de 10^{-8} ; 3×10^{-8} ; 10^{-7} ; 3×10^{-7} ; 10^{-6} ; 3×10^{-6} e 10^{-5} M de verapamil, respectivamente (A) e 0,1; 0,3; 1; 3; 9; 27; 81; 243 e 729 $\mu\text{g/mL}$ do OC-EtOH, respectivamente (B). Piri = pirilamina.

Fonte: Pereira, 2016.

Gráfico 9 – Efeito relaxante do verapamil (A) e do OC-EtOH (B) sobre as contrações tônicas induzidas por 40 mM de KCl (►, ○) e por 3×10^{-7} M de S-(-)-Bay K8644 (■, ►) em íleo isolado de cobaia.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5).

Fonte: Pereira, 2016.

Tabela 12 – Valores de CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$) do verapamil e do OC-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de S-(-)-Bay K8644 e por 40 mM de KCl em íleo isolado de cobaia.

	S-(-)-Bay K8644	KCl
Substância	CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
OC-EtOH	$166,9 \pm 17,8$	$62,9 \pm 9,9$ ***
Verapamil	$0,30 \pm 0,02$ ###	$0,0094 \pm 0,0006$ ¥¥¥, ¢¢¢

Teste *t*; *** $p < 0,001$ (OC-EtOH: S-(-)-Bay K8644 vs. KCl) e ### $p < 0,001$ (S-(-)-Bay K8644: OC-EtOH vs.verapamil). ¥¥¥ $p < 0,001$ (verapamil: S-(-)-Bay K8644 vs. KCl) e ¢¢¢ $p < 0,001$ (KCl: verapamil vs. OC-EtOH) ($n = 5$).

Fonte: Pereira, 2016.

5.4 Triagem farmacológica comportamental e avaliação da toxicidade aguda do OC-EtOH em camundongos

Após a administração oral do OC-EtOH na dose de 2000 mg/kg, não foi observado alteração comportamental dos camundongos fêmeas (n = 6) nas condições experimentais avaliadas durante as 4 horas de observação.

Ao analisar o peso dos animais, não houve alteração durante os 14 dias de observação tanto nos animais controle negativo ($33,5 \pm 0,3$; $33,7 \pm 0,8$ e $34,8 \pm 0,6$ g) como nos animais tratados com o OC-EtOH na dose de 2000 mg/kg ($29,0 \pm 0,5$; $30,0 \pm 0,7$ e $30,7 \pm 0,6$ g) (Tabela 13).

Interessantemente, também foi observado que não houve morte de animais durante o período de observação de 14 dias após a administração de 2000 mg/kg do OC-EtOH.

Tabela 13 – Efeito do OC-EtOH (2000 mg/kg) na avaliação ponderal dos camundongos fêmeas.

Grupo	Peso (g) média ± e. p. m.		
	Dia 0	Dia 7	Dia 14
Controle	33,5 ± 0,3	33,7 ± 0,8	34,8 ± 0,6
OC-EtOH	29,0 ± 0,5	30,0 ± 0,7	30,7 ± 0,6

Test *t* (n = 6).

Fonte: Pereira, 2016.

5.5 Avaliação do efeito do OC-EtOH sobre o trânsito intestinal normal ou induzido por óleo de rícino em camundongos

A administração oral de atropina (2 mg/kg) inibiu o trânsito intestinal percorrido pelo carvão ativado, de um valor controle de $72,9 \pm 1,2\%$ do comprimento total do intestino para $42,2 \pm 1,4\%$, quando comparado ao controle negativo (solução salina 0,9% + Cremophor®) (n = 6).

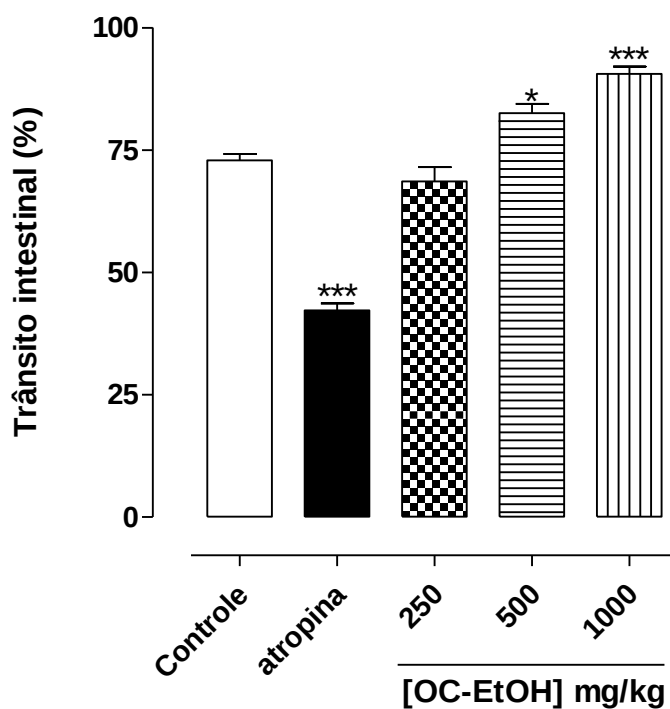
Diferentemente, o OC-EtOH (500 e 1000 mg/kg, v.o.) aumentou de maneira dependente de dose o trânsito intestinal percorrido pelo marcador ($72,9 \pm 1,2\%$) para $82,6 \pm 1,8$ e $90,5 \pm 1,5\%$, respectivamente, apresentando uma DE_{50} de $477,6 \pm 14,8 \mu\text{g/mL}$ (n = 6) (Gráfico 10A).

Quando utilizados os animais em quadro de diarreia, a administração oral do OC-EtOH nas doses de 62,5; 125, 250, 500 e 1000 mg/kg apresentou uma inibição de maneira dependente de dose da distância percorrida pelo marcador de $41,3 \pm 2,3$; $55,6 \pm 1,1$; $73,2 \pm 1,8$; $88,5 \pm 0,9$ e $40,0 \pm 2,8\%$, respectivamente, quando comparadas ao controle negativo (solução salina 0,9% + Cremophor®). Também foi observado que a atropina na dose de 2 mg/kg inibiu $58,2 \pm 3,1\%$ do trânsito intestinal induzido por óleo de rícino quando comparado ao controle negativo (Gráfico 10B).

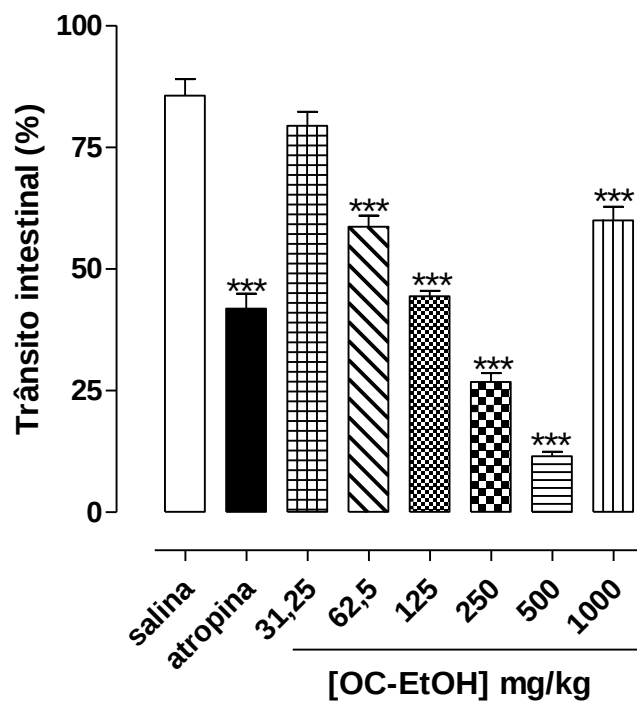
O extrato apresentou uma DE_{50} igual a $93,3 \pm 7,2 \text{ mg/kg}$ e seu efeito máximo em inibir o trânsito intestinal de camundongos em condições de diarreia ($E_{\text{max}} = 88,5 \pm 0,9$), foi observado na dose de 500 mg/kg.

Gráfico 10 – Efeito do OC-EtOH sobre o trânsito intestinal na ausência (A) e na presença (B) do óleo de rícino em camundongos.

A



B



As colunas e as barras verticais representam a percentagem da média e o e.p.m., respectivamente (n = 6). ANOVA “one-way” seguido seguido do pós-teste de Bonferroni; * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ (salina vs. atropina/OC-EtOH).

Fonte: Pereira, 2016.

6 Discussão

Neste trabalho, investigou-se os efeitos do extrato etanólico obtido da esponja *Oceanapia sp* (OC-EtOH) sobre o músculo liso intestinal de roedores, sendo demonstrado, pela primeira vez, que este extrato apresenta efeito dual sobre o trato gastrointestinal, apresentando ação espasmogênica em íleo de cobaia por ativação dos receptores histaminérgicos e dos Cav, e espasmolítica através do bloqueio do influxo de cálcio via Cav1. Além disso, o OC-EtOH não induz sinais de toxicidade aguda em camundongos fêmeas nas condições experimentais avaliadas (2000 mg/kg, v.o.), e *in vivo* o OC-EtOH aumenta a motilidade intestinal normal de camundongos e diminui o trânsito intestinal induzido pelo óleo de rícino, confirmando assim o efeito dual encontrado *in vitro*, e demonstrando uma potencial utilização medicinal da esponja *Oceanapia sp*. em doenças intestinais como a constipação e/ou diarreia.

Estudos com atividades farmacológicas do gênero *Oceanapia* são escassos na literatura científica, limitando-se a estudos que avaliam a atividade antifúngica (NICHOLAS et al., 1999), antibacteriana (MATSUNAGA et al., 2000; MANCINI et al., 2004) e anticancerígena (KIJJOA et al., 2007), não havendo ainda nenhum estudo correlacionando modelos experimentais de músculo liso com esse gênero. Entretanto, alguns produtos de origem marinha já apresentaram efeito na musculatura lisa, podendo citar a alga marrom *Dictyota pulchella* (QUEIROZ et al., 2011), a alga verde *Hydrodictyon reticulatum* (GUTIERREZ et al., 2012), a caulerpina, um alcaloide isolado de algas do gênero *Caulerpa* (CAVALCANTE-SILVA et al., 2013; 2016), a microalga *Spirulina platensis* (BRITO et al., 2015a,b) e a callipeltin A, um peptídeo isolado das esponjas *Callipelta sp.* e *Latrunculia sp.* (TREVISI et al., 2004).

A utilização do modelo experimental de músculo liso é uma ferramenta útil na investigação e descoberta de drogas potencialmente promissoras a serem utilizadas na terapêutica, uma vez que este músculo é amplamente distribuído por todo o corpo, incluindo os vasos sanguíneos, as vias respiratórias e os tratos gastrointestinal, urinário e reprodutor, apresentando uma variedade de funções essenciais à vida, tais como controle da pressão arterial, respiração e peristaltismo gastrointestinal, dentre outros. Anormalidades no processo de contratilidade do músculo liso podem acarretar várias desordens e doenças como hipertensão, asma, disfunção erétil, dispepsia, cólicas uterinas e intestinais, diarreia e constipação (KIM et al., 2008).

Com a finalidade de se investigar uma possível atividade sobre a musculatura lisa intestinal, avaliou-se o efeito do OC-EtOH sobre tônus basal do íleo de cobaia.

Dessa forma foi constatado que o extrato promove uma contração dependente de concentração (Figura 7, Gráfico 1), evidenciando-se um efeito espasmogênico do OC-EtOH.

Resultados semelhantes já foram descritos na literatura, para alguns produtos naturais vegetais, a exemplo das espécies *Swietenia humilis* (PERUSQUÍA et al., 1997); *Loranthus ferrugineus* (AMEER et al., 2009); *Anthocleista vogelii* (ATEUFACK et al., 2010); *Urginea indica* (ABBAS et al., 2012); *Fumaria parviflora* (MEHMOOD et al., 2012); *Terminalia chebula* (MARD et al., 2013), que também apresentaram efeitos espasmogênico em diversos músculos lisos e em produtos naturais marinhos, pode-se citar as esponjas *Callipelta* sp. e *Latrunculia* sp., que produzem um peptídeo chamado callipeltin A, que também apresentou atividade espasmogênica em aorta de cobaia (TREVISI et al., 2004).

O íleo de cobaia apresenta uma contração bifásica, onde o componente fásico é caracterizado por uma contração rápida e transiente e é causada pela liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares mediados por IP_3 (ABDEL-LATIF, 1989; KOBAYASHI et al., 1989), com uma curta duração (aproximadamente 30 segundos). Enquanto que o componente tônico é caracterizado por uma contração sustentada que se desenvolve lentamente (ABDEL-LATIF, 1989; BOLTON, 1979), e essa contração é atribuída ao influxo de Ca^{2+} através dos Cav (JIM et al., 1981). Porém, particularmente nesse músculo ambas as contrações (fásica e tônica) dependem do Ca^{2+} extracelular, sendo a influência desse íon maior sobre a resposta tônica (TRIGGLE et al., 1979; HONDA; TAKANO; KAMIYA, 1996).

Diante do exposto, decidiu-se avaliar também o efeito do OC-EtOH sobre o componente tônico da contração induzida por diferentes agentes contráteis, como o KCl que possui um mecanismo de contração por um acoplamento eletromecânico, o CCh e a histamina que desencadeiam a contração por um acoplamento misto (BOLTON et al., 1981) em íleo de cobaia. Assim, observou-se, sobre as contrações tônicas induzidas por KCl e por histamina, que o OC-EtOH promove um efeito dual, ou seja, inicialmente o extrato induz contração transiente seguida de um relaxamento lento, ambos de maneira dependente de concentração (Figura 8, Gráficos 2 e 3, Tabela 3), não apresentando diferenças entre as potências espasmolíticas, comprovando que o extrato possui metabólitos capazes de promover tanto a contração como o relaxamento em íleo de cobaia. Ainda nesse contexto, pode-se

constatar, que o OC-EtOH apresentou uma maior potência no seu efeito espasmogênico quando comparados com sua eficácia espasmolítica.

Portanto, de acordo com os resultados obtidos até o momento, fica caracterizado, pela primeira vez na literatura científica, que o OC-EtOH, um produto natural de origem marinha animal, possui uma resposta dual (efeitos espasmogênico e espasmolítico) no músculo liso intestinal de cobaia. Esse tipo de efeito já foi relatado para algumas plantas terrestres como, por exemplo, as espécies *Sida pakistanica* (HASSAN-GILANI et al., 1999), *Piper betle* (GILANI et al., 2000), *Catha edulis* (MAKONNEN, 2000), *Calendula officinalis* (BASHIR et al., 2006), *Conyza bonariensis* (BUKHARI et al., 2013), *Carissa carandas* (MEHMOOD et al., 2014) e *Linum usitatissimum* (PALLA; GILANI, 2015).

Tendo em vista o efeito dual promovido pelo OC-EtOH em íleo de cobaia, decidiu-se investigar inicialmente o mecanismo de ação do efeito espasmogênico desse extrato.

Visto que no músculo liso intestinal há diversos meios de promover a contração muscular, podendo citar, por exemplo, ativação dos receptores muscarínicos M_3 amplamente distribuídos no trato gastrointestinal (HARRINGTON, 2010), dos receptores histaminérgicos H_1 que também são responsáveis por aumentar a tensão gastrointestinal (BOLTON et al., 1981), bem como dos receptores serotoninérgicos, principalmente o $5-HT_{2A}$ (ENGEL et al., 1984) e das prostaglandinas E (PGE), por meio da ligação ao receptor EP_1 e EP_3 e prostaglandina F (PGF), por meio da ativação de receptores $PGF_{2\alpha}$, que contraem o músculo longitudinal do estômago ao cólon e no músculo circular, pois quem comanda a contração é a PGF (KADLEC; RADOMIROV, 1975), onde o efeito contrátil produzido pela ativação desses receptores se dá por meio da via de sinalização $G_{q/11}$ - $PLC\beta$. Com isso, é importante investigar quais dessas vias estariam presentes no mecanismo de contração do OC-EtOH.

A coexpressão dos receptores M_2 e M_3 sobre o músculo liso intestinal é bem descrita (KERR et al., 1995; AL-SAFFAR; HELLSTROM, 2001), isto sugere que esses receptores não apenas medeiam a estimulação direta da contratilidade do músculo, como também estão envolvidos na regulação da liberação de neurotransmissores (HARRINGTON et al., 2010). A ação do sistema parassimpático do músculo liso intestinal se dá principalmente pela ativação dos receptores muscarínicos M_3 . Com a

ligação do agonista nesses receptores como, por exemplo, a ACh, desencadeia uma ativação da via de sinalização $G_{q/11}$ -PLC β que leva a um aumento da $[Ca^{2+}]_c$ e, por conseguinte, a contração do músculo liso (CANDELL et al., 1990). Também foi descrita a participação dos receptores M_2 (EHLERT; THOMAS, 1995), que ativa a via da proteína G inibitória ($G_{i/o}$) na contração do músculo liso intestinal, porém a ativação apenas desse receptor não induz uma contração suficiente, mas quando ativado junto com o receptor M_3 (EHLERT, 2003) ocorre ativação de correntes catiônicas não seletivas e inibição dos canais de potássio de grande condutância ativados pelo Ca^{2+} (BK_{Ca}), o que contribui para a indução da contração (THOMAS; EHLERT, 1994; SAWYER; EHLERT, 1999; EHLERT et al., 2001).

Para avaliar a participação dos receptores muscarínicos no mecanismo espasmogênico do OC-EtOH, utilizou-se o fármaco padrão atropina, um bloqueador não seletivo dos receptores muscarínicos. E pode-se observar que diferentes concentrações de atropina não inibiram as curvas concentrações-resposta cumulativas ao extrato, não havendo diferenças entre o E_{max} e a CE_{50} (Gráfico 4B, Tabela 5). Diferentemente, as curvas concentrações-resposta cumulativas ao CCh na presença de diversas concentrações de atropina foram desviadas para adireita o que caracteriza um antagonismo do tipo competitivo, não havendo alteração no E_{max} e ao aumentar as concentrações de atropina, houve diminuição na potência contrátil do CCh (Gráfico 4A, Tabela 4), com esses resultados pode-se descartar a ativação dos receptores muscarínicos no efeito contrátil promovido pelo OC-EtOH em íleo de cobaia. Descarta-se também a possibilidade do OC-EtOH conter algum constituinte similar a ACh para promover a contração neste órgão.

Em músculos lisos, tal como o íleo de cobaia, que geram livremente potenciais de ação muscular, a modulação do potencial de ação é disparada por baixas concentrações de histamina, sendo este um importante mecanismo pelo qual a tensão muscular é aumentada (BULBRING; BURNSTOCK, 1960; BOLTON, 1979; BOLTON et al., 1981). O efeito contrátil produzido pela histamina também envolve ativação da via de sinalização $G_{q/11}$ -PLC β , após a ligação aos receptores H_1 (DONALDSON; HILL, 1986; MOREL; HARDY; GODFRAIND, 1987; BOLTON; LIM, 1989). Os receptores H_1 encontram-se em uma ampla variedade de tecidos, incluindo: cérebro de mamíferos; músculo liso das vias aéreas, sistemas geniturinário e cardiovascular, células endoteliais, medula adrenal e trato gastrointestinal (HILL, 1990).

Para testar a hipótese de que o OC-EtOH poderia agir nos receptores histaminérgicos para produzir o seu efeito contrátil, utilizou-se a pirilamina como fármaco padrão, que é um antagonista dos receptores H₁. Foi constatado que curvas concentrações-resposta cumulativas ao OC-EtOH na presença de pirilamina foram desviadas para a direita, porém, houve a diminuição tanto na potência como no E_{max} do OC-EtOH, sugerindo, dessa forma, um antagonismo do tipo não competitivo (Gráfico 5B, Tabela 7). No controle positivo as curvas concentrações-resposta cumulativas à histamina na presença de pirilamina foram deslocadas para a direita, sem a redução do E_{max}, o que caracteriza um antagonismo do tipo competitivo (Gráfico 5A, Tabela 6), como era esperado.

É relatado na literatura a possibilidade de dois tipos de antagonismo não competitivo: o antagonismo alostérico, quando há a ligação do antagonista em um sítio distinto ao do agonista, e o antagonismo pseudoirreversível, que acontece quando o antagonista se liga no mesmo sítio de ligação do agonista (BLUMENTHAL, GARRISON, 2011). O perfil do Gráfico 5B representa um antagonismo competitivo pseudoirreversível, uma vez que não houve saturação do efeito, ou seja, a inibição da resposta contrátil do OC-EtOH na presença de concentrações crescentes de pirilamina foi completamente abolida. Como M₃ e H₁ usam os mesmos sistemas efetores de transdução de sinal, isso sugere que o sítio de ação do OC-EtOH não está interagindo na via *downstream* após a ativação da proteína G e nem na maquinaria contrátil em si. Como na presença de pirilamina o efeito contrátil do OC-EtOH foi completamente abolido, sugere-se que, provavelmente, a participação dos outros receptores supracitados não estejam envolvidas no mecanismo de contração do extrato.

No músculo liso um aumento na $[Ca^{2+}]_c$ é a causa primária para a produção da contração (HILL-EUBANKS et al., 2011). Os mecanismos que levam a uma resposta contrátil ocorrem devido a uma despolarização de membrana diretamente associada ao aumento da concentração extracelular de potássio ($[K^+]_e$) ou indiretamente pela ligação dos agonistas aos seus receptores levando à abertura dos Cav, na membrana plasmática, causando aumento de Ca²⁺ no citosol e, conseqüentemente, a contração (REMBOLD, 1996), sendo dessa maneira, os Cav um elemento indispensável no processo de inicialização e/ou manutenção da contração muscular lisa.

Diante dessas premissas, decidiu-se avaliar se os Cav podem estar envolvido

no mecanismo de ação espasmogênica do OC-EtOH. Existem dez membros de Cav, que são divididos em dois grupos: ativados por alta voltagem e os ativados por baixa voltagem. Os Cav de baixa voltagem são os canais do tipo T, compreendendo três membros: Cav3.1, 3.2 e 3.3 que são insensíveis à di-hidropiridinas. Os outros sete membros dos Cav são canais ativados por alta voltagem e subdivididos em tipo L (Cav1.1, 1.2, 1.3 e 1.4) que são sensíveis a di-hidropiridina, tipo P/Q (Cav2.1), tipo N (Cav2.2) e tipo R (Cav2.3) que são insensíveis a di-hidropiridinas. No músculo liso intestinal, a subfamília dos Cav1 são os mais expressos e melhores caracterizados, sendo os maiores responsáveis pelo influxo de Ca^{2+} (CATTERALL, 2011).

Para avaliar a participação dos Cav no efeito espasmogênico do OC-EtOH foi utilizado o verapamil, fármaco padrão bloqueador dos Cav. As curvas concentrações-resposta cumulativas ao OC-EtOH na presença de diferentes concentrações de verapamil foram desviadas para a direita, porém houve a diminuição tanto na potência quanto no E_{max} do OC-EtOH (Gráfico 6, Tabela 8). Com isso pode-se sugerir que algum metabólito secundário proveniente do OC-EtOH também está ativando os Cav para promover seu efeito espasmogênico em íleo de cobaia.

Como foi visto na etapa de triagem farmacológica, o OC-EtOH possui metabólitos que produzem um efeito dual no músculo liso intestinal, podendo ser tanto espasmogênico como espasmolítico, a depender da condição inicial do órgão. Assim, dando continuidade a este estudo, decidiu-se prosseguir com o estudo do mecanismo de ação envolvido na atividade espasmolítica do OC-EtOH.

Ao avaliar o relaxamento do extrato sobre o componente tônico das contrações induzidas por KCl e por histamina, observou-se que o extrato induziu uma contração transiente dependente de concentração e em seguida promoveu um relaxamento também dependente de concentração do íleo de cobaia (Figura 8). Para verificar se esse componente espasmogênico induzido pelo OC-EtOH estaria interferindo na atividade relaxante, decidiu-se fazer o mesmo protocolo experimental, na presença de pirilamina, para tentar remover o componente espasmogênico do OC-EtOH. Pode-se observar que na presença do antagonista H_1 , as contrações promovidas pelo extrato sobre o componente tônico foram abolidas e que o relaxamento causado pelo OC-EtOH sobre a contração tônica induzida por KCl na presença da pirilamina foi cerca de 2 vezes mais potente quando comparado ao relaxamento do extrato na

ausência do antagonista (Gráfico 7, Tabela 9), levando a concluir que o efeito contrátil transiente, promovido pelo OC-EtOH é devido ativação dos receptores H_1 .

O OC-EtOH inibiu de maneira dependente de concentração as contrações tônicas induzidas pelos três diferentes agentes contráteis e o fato do relaxamento não ter diferido quando comparado o parâmetro de potência, levantou-se a hipótese de que o OC-EtOH poderia estar agindo por bloqueio do influxo de Ca^{2+} através dos Ca_v , pois tanto os agonistas de acoplamento misto (histamina e CCh) como os de acoplamento eletromecânico (KCl) levam a manutenção da contração tônica, quase que exclusivamente, por influxo de cálcio através dos Ca_v (BOLTON, 1979; REMBOLD, 1996; BOLTON et al., 2006).

Se essa hipótese for positiva, esperava-se que o OC-EtOH antagonizasse as contrações induzidas por $CaCl_2$ em meio despolarizante nominalmente sem Ca^{2+} , onde a contração ocorre quase que exclusivamente pelo Ca^{2+} proveniente do meio extracelular, pois a despolarização promovida pela elevada $[K^+]_e$ induz a abertura dos Ca_v (REMBOLD, 1996). Diante disso, utilizou-se o verapamil como fármaco padrão, para se obter o controle positivo. Com isso observou-se que na presença do OC-EtOH pré-incubado em diferentes concentrações, as curvas cumulativas ao $CaCl_2$ foram desviadas para direita de forma não paralela e com redução do E_{max} (Gráfico 8B e Tabela 11). Resultado semelhante ao controle positivo, onde as curvas concentrações-resposta cumulativas induzidas com $CaCl_2$ na presença de diferentes concentrações de verapamil foram desviadas para a direita de maneira não paralela com redução do E_{max} (Gráfico 8A, Tabela 10). Esses resultados reforçam a hipótese de que o extrato poderia inibir o influxo de Ca^{2+} através dos Ca_v para exercer seu efeito espasmolítico.

Como já descrito anteriormente, os Ca_v estão presentes na maioria das células excitáveis (ALEXANDER; MATHIE; PETERS, 2011) e diante da evidência da participação desses canais também no efeito espasmolítico do OC-EtOH, surgiu um questionamento de qual subtipo de canal de Ca^{2+} o extrato estaria bloqueando. Com o intuito de verificar se os Ca_v envolvido na ação espasmolítica do OC-EtOH seria os Ca_v1 , avaliou-se o efeito do mesmo sobre as contrações tônicas induzidas pelo derivado di-hidropiridínico S-(-)-Bay K8644, um agonista seletivo dos Ca_v1 , que age por ligação direta na sua subunidade α_1 e não por despolarização (SPEDDING, PAOLETTI, 1992).

Uma curva controle foi realizada utilizando o verapamil para relaxar o íleo pré-contráído induzida tanto com KCl, quanto com S-(-)-Bay K8644, confirmando a veracidade deste experimento (Gráfico 9A). Em seguida, este mesmo experimento foi realizado na presença de pirilamina, para que o componente espasmogênico do extrato fosse removido e com isso observou-se que o OC-EtOH relaxou de maneira dependente de concentração o órgão pré-contráído com S-(-)-Bay K8644, porém esse relaxamento foi 2,6 vezes menos potente ao observado quando o órgão se encontrava pré-contráído com KCl, um agente despolarizante (Gráfico 9B, Tabela 12). Esses resultados tomados em conjunto sugerem que, de fato, o OC-EtOH bloqueia canais de Ca^{2+} para exercer seu efeito espasmolítico em íleo de cobaia, e que o subtipo de canal envolvido é os Cav1, porém não se descarta a participação de outras vias de sinalização, já que as duas curvas não foram sobrepostas.

Assim, de acordo com os resultados obtidos, pode-se evidenciar que o inédito efeito dual do produto natural marinho OC-EtOH ocorre através da modulação dos receptores histaminérgicos, bem como dos Cav. Semelhante aos achados desse estudo, produtos naturais terrestres com perfil dual de resposta são citados na literatura por ocorrer através de múltiplas vias incluindo ativação das vias colinérgicas e/ou histaminérgicas, associados ao bloqueio dos Cav, sendo importantes moduladores em potencial da função gastrointestinal (GILLANI, 2000; BASHIR et al., 2006; MEHMOOD et al., 2014; PALLA; GILANI, 2015).

Antes de se iniciar qualquer estudo farmacológico *in vivo* é necessário avaliar uma possível ação tóxica do produto-teste. Os ensaios de toxicidade pré-clínica aguda são utilizados para avaliar a toxicidade produzida por um produto-teste quando este é administrado em uma ou mais doses durante um período não superior a 24 horas e continuando a observação dos animais por 14 dias após a sua administração (ANVISA, 2010). De acordo com o guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos da ANVISA (2010), os estudos para a determinação da DL₅₀ não são necessários e podem ser utilizados métodos alternativos para a sua estimativa envolvendo um menor número de animais, tais como os preconizados no guia 423/2001 da OEDC (*Organisation for Economic Co-operation and Development*).

Não é possível obter um cálculo preciso da DL₅₀ ao utilizar este método, porém o mesmo fornece uma estimativa do seu valor, e permite uma classificação do

produto-teste em categorias de acordo com o *Globally Harmonized Classification System* (GHS), este documento é responsável por definir os perigos de produtos químicos, que contém instruções para atender à exigência básica de qualquer sistema de comunicação de perigos, que é decidir se o produto químico fabricado ou fornecido é perigoso, além de preparar um rótulo ou uma Ficha de Informação de Segurança para Produtos Químicos apropriados.

De acordo com este guia, os estudos são realizados administrando-se uma dose do produto-teste a um grupo de animais ($n = 3$) e dependendo do número de mortes este método é repetido com mais outro grupo de animais ($n = 3$). Este guia preconiza as doses iniciais a serem utilizadas, sendo essas de 5, 50, 300 e 2000 mg/kg (Anexo 3), além de recomendar que sejam utilizados camundongos fêmeas por serem animais mais sensíveis a toxicidade (OECD, 2001). Com o intuito de utilizar o menor número de animais, iniciou-se os experimentos *in vivo* com a dose de 2000 mg/kg.

Com isso, após o tratamento oral agudo com a dose de 2000 mg/kg ($n = 3$, v.o.) do OC-EtOH, a maior dose a ser testada para um extrato, os animais eram observados por 4 horas e diversos parâmetros comportamentais foram avaliados (Anexo 2). Durante esse tempo de observação não houve nenhuma mudança comportamental dos animais, dessa forma podendo descartar algum efeito tóxico sobre o sistema nervoso central e sistema nervoso autônomo. Também pode-se constatar que não houve a morte de nenhum animal durante os 14 dias de observação, com esse resultado repetiu-se o método com um grupo de mais 3 animais, como preconizado no guia 423/2001 da OEDC. Também não houve interferência na evolução ponderal desses animais (Tabela 13). Diante desses resultados pode-se concluir que na dose utilizada (2000 mg/kg) o OC-EtOH não apresentou efeito tóxico, e que segundo o guia nº 423 da OEDC esse resultado caracteriza uma baixa toxicidade aguda e uma estimativa da DL_{50} igual ou superior a 5000 mg/kg. Esse resultado nos fornece uma segurança na utilização desse extrato para os demais protocolos experimentais *in vivo* utilizados nesse trabalho.

Os produtos naturais que possuem uma resposta dual apresentam certa vantagem com relação aos fármacos com efeito de agonista pleno sobre as vias histaminérgicas e colinérgicas, dados os conhecidos efeitos colaterais inerentes à ativação das mesmas, como cólicas abdominais, bradicardia, salivação, convulsões

ou aumentos na frequência respiratória (PASRICHA, 2006). Esses produtos com efeito dual comportam-se como agonistas parciais sobre o TGI com uma combinação de efeitos que podem ser sinérgicos e/ou que neutralizam os possíveis efeitos colaterais (GILANI, 2005).

Outra grande riqueza dos produtos naturais, mostrados em vários estudos, é que o mesmo composto pode ser utilizado simultaneamente para sintomas alternados (GHAYUR; GILANI, 2005), podendo citar como exemplo as cascas de *Psyllium husk* e gengibre (*Zingiber officinale*), que são duplamente eficazes na diarreia e constipação, devido à presença de componentes com ação espasmolítica e espasmogênica (GHAYUR; GILANI, 2005; MEHMOOD et al., 2011).

A diarreia e a constipação são desordens do TGI que pode ocorrer por causas primárias ou secundárias. Também são associadas com os principais sintomas de doenças crônicas que incluem a síndrome do intestino irritável que pode predominar a diarreia ou a constipação ou predominar sintomas alternados (NICE, 2008).

A diarreia é a segunda causa de morte entre crianças abaixo de cinco anos (LIU et al., 2012) e a constipação, embora seja relativamente menos associada com a mortalidade, ainda pode causar a perfuração do intestino causando mortes. Além disso, hemorroidas, fissuras anais e prolapso retal também foram relatados como consequência da constipação (BATTISTELLA; ALIBHAI, 2004). Assim, tanto a diarreia como a constipação estão associadas à morbidade, à inconveniência social, à perda de produtividade no trabalho e ao consumo de recursos médicos (CAMILLERI; MURRAY, 2008).

Uma vez que o OC-EtOH apresentou atividade espasmogênica e espasmolítica no músculo liso intestinal e como a diarreia e a constipação podem ser causadas, entre outros fatores, por alterações da motilidade intestinal (FIELD; SEMRAD, 1993), resolveu-se inicialmente investigar se o OC-EtOH alteraria a motilidade intestinal em camundongos.

Nos modelos de trânsitos intestinais normal e induzido por óleo de rícino (uma condição patológica) foi utilizado o marcador à base de carvão ativado, que por ser uma ferramenta simples, e tem sido bastante utilizado para avaliação de efeitos laxativos (GAGINELLA et al., 1994). Este método consiste na administração deste marcador na avaliação do seu trajeto no intestino delgado (GURGEL et al., 2001). Nestes dois modelos foi utilizado como fármaco padrão a atropina, um antagonista

muscarínico, que apresenta a sua ação por competir pelo mesmo sítio receptor com a ACh, exercendo efeitos como redução do tônus, da amplitude e da frequência das contrações peristálticas (BROWN; TAYLOR, 2006).

Interessantemente, o OC-EtOH não inibiu o trânsito intestinal normal de camundongos, porém foi observado que nas doses de 500 e 1000 mg/kg o extrato promoveu um aumento da distância percorrida pelo carvão ativado, quando foi comparado com o controle negativo (Gráfico 10A). Diante desses resultados e corroborando os dados encontrados *in vitro*, pode-se sugerir que o OC-EtOH promove um efeito laxativo em condições fisiológicas normais, porém outros estudos serão necessários para a comprovação desse efeito laxante induzido pelo extrato.

É relatado na literatura que o óleo de rícino, por meio do seu componente majoritário, o ácido ricinoleico, promove sua atividade laxativa por vários mecanismos de ação, como o aumento da secreção de água e de eletrólitos e da motilidade, no entanto, não se sabe ao certo se esses mecanismos atuam de forma conjunta ou separadamente. Sabe-se que o ácido ricinoleico inibe a Na^+/K^+ -ATPase, reduzindo a absorção de líquido normal (IZZU, 1999), além de promover a ativação da ciclase de adenilil, atuando na estimulação da produção de cAMP (GAGINELLA; BASS, 1978). O ácido ricinoleico também é responsável por produzir ações irritantes e inflamatórias na mucosa intestinal, levando à liberação de várias substâncias mediadoras inflamatórias, como as prostaglandinas, o óxido nítrico (NO), o fator de ativação plaquetária (PAF) e as taquicinininas (AWOUTERS et al., 1978), além do fato de o mesmo ser um agonista dos receptores da prostaglandina E_2 (PGE_2), EP_3 e EP_4 , sendo que no músculo liso sua atividade se dá principalmente pela ativação do receptor EP_3 (TUNARU et al., 2012).

Resultados distintos foram observados, no modelo de trânsito induzido por óleo de rícino, onde o OC-EtOH inibiu de forma dependente de dose a motilidade intestinal de camundongos em quadros de diarreia (Gráfico 10B), o que demonstra que o extrato promove efeito antidiarreico e este se dá por inibição na motilidade intestinal, ocorrendo apenas em condições patológicas, o que realmente é desejado. Esse efeito pode auxiliar na redução do 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 (GURGEL et al., 2001).

A presença do efeito dual do OC-EtOH, sendo espasmogênico por ativar os

receptores histaminérgicos e os Cav, e espasmolítico por bloqueio do influxo de Ca^{2+} através dos Cav tem seus possíveis benefícios por atuar de maneira mais balanceada do que os compostos com um único alvo e, conseqüentemente, essas substâncias com efeito dual apresentariam uma combinação de efeito farmacológico satisfatório e/ou diminuição de efeitos colaterais (GILANI, 2005). Por fim, os resultados obtidos nesse estudo corroboram a filosofia de que produtos naturais devem ser valorizados como um todo, pois esses complexos apresentam vários alvos para tratar uma referida doença (AHMED; GILANI, 2014), mostrando uma possível utilização medicinal para a *Oceanapia sp.* em duas doenças de características opostas, como a diarreia e a constipação.

7 Conclusões

Na avaliação da atividade sobre a musculatura lisa intestinal de roedores, pode-se concluir que o OC-EtOH:

- ✓ Demonstrou efeito dual em íleo de cobaia, apresentando:
 - Atividade espasmogênica por ativação dos receptores histaminérgicos H₁ e dos Cav;
 - Efeito espasmolítico por bloqueio do influxo de cálcio através dos Cav1;
- ✓ Não induziu sinais de toxicidade aguda em camundongos nas condições avaliadas, apresentando, assim, uma baixa toxicidade;
- ✓ Apresentou efeito dual em camundongos, por aumentar a motilidade intestinal normal de camundongos e diminuir o trânsito intestinal induzido por óleo de rícino, demonstrando uma potencial utilização medicinal da esponja *Oceanapia sp.* em doenças intestinais como a constipação e/ou diarreia.

Referências

ABBAS, S.; BASHIR, S.; KHAN, A.; MEHMOOD, M. H.; GILANI, A. H. Gastrointestinal stimulant effect of *Urginea indica* Kunth. and involvement of muscarinic receptors. **Phytotherapy Research**, v. 26, n. 5, p. 704-708, 2012.

ABDEL-LATIF, A. A. Calcium mobilizing receptors, polyphosphoinositides, generation of second messengers and contraction in mammalian smooth muscle: historical perspectives and current status. **Life Science**, v. 45, p. 757-786, 1989.

AHMED, T.; GILANI, A. H. Therapeutic potential of turmeric in Alzheimer's disease: curcumin or curcuminoids? **Phytotherapy Research**, v. 28, n. 4, p. 517-525, 2014.

ALEXANDER, S. P. H.; MATHIE, A.; PETERS, J. A. Guide to Receptors and Channels (GRAC), 2nd edition (2007 Revision). **British Journal of Pharmacology**, v. 150 (Suppl. 1), p. S1 – S168, 2007.

ALEXANDER, S. P. H.; MATHIE, A.; PETERS, J. A. Guide to Receptors and Channels (GRAC), 5rd edition. **British Journal of Pharmacology**, v. 164, (Suppl 1), p. S142-143, 2011.

ALMEIDA, C. E.; KARNIKOWSKI, M. G. O.; FOLETO, R.; BALDISSEROTTO, B. Analysis of antidiarrhoeic effect of plants used in popular medicine. **Revista de Saúde Pública**, v. 29, n. 6, p. 428-33, 1995.

ALMEIDA, R. N.; FACÃO, A. C. G. M.; DINIZ, R. S. T.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; POLARI, R. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; AGRA, M. F.; DUARTE, J. C.; FERREIRA, C. D.; ANTONIOLLI, A. R.; ARAÚJO, C. C. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no SNC e alguns dados experimentais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 80, p. 72-76, 1999.

AL-SAFFAR, A.; HELLSTROM, P. M. Contractile responses to natural tachykinins and selective tachykinin analogs in normal and inflamed ileal and colonic muscle. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 36, p. 485–93, 2001.

AMEER, O. Z.; SALMAN, I. M.; SIDDIQUI, M. J. A.; YAM, M. F.; SRIRAMANENI, R. N.; SADIKUN, A.; ISMAIL, Z.; SHAH, A. M.; ASMAWI, M. Z. Characterization of the

possible mechanisms underlying the hypotensive and spasmogenic effects of *Loranthus ferrugineus* methanolic extract. **The American journal of Chinese medicine**, v. 37, n. 05, p. 991-1008, 2009.

ANVISA. Guia para a condução de Estudos não clínicos de Segurança necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos. www.anvisa.gov.br, Brasília, 01 de março de 2010.

ARTAN, M.; LI, Y.; KARADENIZ, F.; LEE, S. H.; KIM, M. M.; KIM, S. K. Anti-HIV-1 activity of phloroglucinol derivative, 6, 6'-bieckol, from *Ecklonia cava*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 7921-7926, 2008.

ATEUFACK, G.; NGUELEFACK, T. B.; TANE, P.; KAMANY, A. Spasmogenic activity of the aqueous and methanol extracts of the stem bark of *Anthocleista vogelii* planch (Loganiaceae) in rats. **Pharmacologyonline**, v. 1, p. 86-101, 2010.

AWOUTERS, F.; NEIMEGEERS, C. J. E.; LENAERT, F. M.; JASSEN. Delay of castor oil diarrhoeal in rats; A new way to evaluate inhibitors of prostaglandin's biosynthesis. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 30, p. 41-45, 1978.

BASHIR, S., JANBAZ, K. H., JABEEN, Q., GILANI, A. H. Studies on spasmogenic and spasmolytic activities of *Calendula officinalis* flowers. **Phytotherapy Research**, v. 20, n. 10, p. 906-910, 2006.

BATTISTELLA, M.; ALIBHAI, S. Evaluation and treatment of constipation. **Geriatrics & Aging**, v. 5, n. 10, p. 23-27, 2004.

BELL, G. I.; KAYANO, T.; BUSE, J. B.; BURANT, C. F.; TAKEDA, J.; LIN, D.; FUKUMOTO, H.; SEINO, S. Molecular biology of mammalian glucose transporters. **Diabetes Care**, v. 13, p. 198-208, 1990.

BERGMANN, W.; FEENEY, R. J. Contributions to the study of marine products. Xxxii. The nucleosides of sponges. I. **The Journal of Organic Chemistry**, v 16, p. 981-987, 1951.

BIELEFELDT K.; LEVINTHAL D. J.; NUSRAT S. Effective constipation treatment changes more than bowel frequency: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Neurogastroenterology and Motility**, v. 22, n. 1, p. 31-45, 2016

BLUMENTHAL, D. K.; GARRISON, J. C. Pharmacodynamics: molecular mechanisms of drug action. In: BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. (Ed.) **Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 12th ed. San Diego, CA: The McGraw-Hill Companies, Inc. 2011.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; KEYZERS, R. A.; MUNRO, M. H. G.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. **Natural Products Report**. v. 31, p. 160–258, 2014.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; MUNRO, M. H. G.; NORTHCOTE, P. T.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. **Natural Products Report**. v. 22, p. 15–61, 2005.

BOLTON, T. B. Calcium events in smooth muscles and their interstitial cells; physiological roles of sparks. **The Journal of Physiology**, v. 570, p. 5-11, 2006.

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

BOLTON, T. B.; CLARK, J. P.; KITAMURA, K.; AND LANG, R. J. Evidence that histamine and carbachol may open the same ion channels in longitudinal smooth muscle of guinea-pig ileum. **Journal of Physiology**, v. 320, p. 363–379, 1981.

BOLTON, T. B.; LIM, S. P. Properties of calcium stores and transient outward currents in single smooth muscle cells of rabbit intestine. **Journal of Physiology**, v. 409, p. 385–401, 1989.

BOYD, K. G.; HARPER, M. K.; FAULKNER, D. J. Oceanapamine, a sesquiterpene alkaloid from the Philippine sponge *Oceanapia* sp. **Journal of Natural Products**, v. 58, n. 2, p. 302-5, 1995.

BRASIL, Ministério da Saúde. Vigilância em saúde para prevenção de surtos de doenças de transmissão hídrica decorrentes dos eventos climáticos extremos. 2015.

Disponível em <http://177.153.6.85/cisa/theme/apres/a1716.pdf>. Acesso em 12 de janeiro de 2016.

BREUNIG, E.; MICHEL, K.; ZELLER, F.; SEIDL, S.; WEYHERN, C. W.; SCHEMANN, M. Histamine excites neurons in the human submucous plexus through activation of H1, H2, H3 and H4 receptors. **Journal of Physiology**, v. 583, n.2, p. 731–742, 2007.

BRITO, A. F.; SILVA, A. S.; PEREIRA, J. C.; SILVA, B. A. Intensity of swimming exercise influences aortic reactivity in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 11, p. 996–1003, 2015a.

BRITO, A. F.; SILVA, A. S.; SOUZA, I. L.; PEREIRA, J. C.; MARTINS, I. R.; SILVA, B. A. Intensity of swimming exercise influences tracheal reactivity in rats. **Journal of Smooth Muscle Research**, v. 51, p. 70-81, 2015b.

BROWN, J. H.; TAYLOR, P. Muscarinic receptor agonists and antagonists. In: BRONTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. (Org.). **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 11. ed. USA: Mc Graw Hill, cap. 7, p. 183-200, 2006.

BRUSCA, R. C.; BRUSCA, G. J. Phylum Porifera: the sponges. In A. D. Sinauer (ed.), **Invertebrates**. **Sinauer Press**, p. 181–210, 1990.

BUKHARI, I. A.; SHAH, A. J.; KHAN, R. A.; MEO, S. A.; KHAN, A.; GILANI, A. H. Gut modulator effects of *Conyza bonariensis* explain its traditional use in constipation and diarrhea. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 17, n. 4, p. 552, 2013.

BULBRING, E.; BURNSTOCK, G. Membrane potential changes associated with tachyphylaxis and potentiation of the response to stimulating drugs in smooth muscle. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, v. 15, p. 611–624, 1960.

BUTLER, M. S.; ROBERTSON, A. A. B; COOPER, M. A. Natural product and natural product derived drugs in clinical trials. **Natural Product Reports**, v. 31, n. 11, p. 1612-1661, 2014.

CAMILLERI, M.; MURRAY, A. J. **Diarrhea and constipation**. In: Fauci, A. S., Braunwald, E., Kasper, D. L. (Eds.), *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 18th ed. McGraw-Hill, NewYork, p.245–254, 2008.

CAPON, R. J.; SKENE, C.; LIU, E. H. T.; LACEY, E.; GILL, J. H.; HEILAND, K.; & FRIEDEL, T. The isolation and synthesis of novel nematocidal dithiocyanates from an Australian marine sponge, *Oceanapia* sp. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 66, n. 23, p. 7765-7769, 2001.

CARROLL, A. R.; NGO, A.; QUINN, R. J.; REDBURN, J.; HOOPER, J. N. Petrosamine b, an inhibitor of the helicobacter pylori enzyme aspartyl semialdehyde dehydrogenase from the australian sponge *Oceanapia* sp. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 5, p. 804-806, 2005.

CATTERALL, W. A. Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. **Annual Review of Cell & Developmental Biology**, v. 16, p. 521-555, 2000.

CATTERALL, W. A. Voltage-gated calcium channels. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 11, p. 1-24, 2011.

CATTERALL, W. A.; PEREZ-REYES, E.; SNUTCH, T. P.; STRIESSNIG, J. International union of pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. **Pharmacological Reviews**, v. 57, n. 4, p. 411-425, 2005.

CAULFIELD, M. P.; BIRDSALL, N. J. International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. **Pharmacological Reviews**, v. 50, p. 279–90, 1998.

CAVALCANTE-SILVA, L. H. A.; CORREIA, A. C. D. C.; SOUSA, J. C. F.; BARBOSA-FILHO J. M.; SANTOS, B. V. D. O.; DE MIRANDA, G. E. C.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S; CAVALCANTE, F. A. Involvement of β adrenergic receptors in spasmolytic effect of caulerpine on guinea pig ileum. **Natural Product Research**, p. 1-6, 2016.

CAVALCANTE-SILVA, L. H. A.; CORREIA, A. C. C.; BARBOSA-FILHO, J. M., SILVA, B. A.; SANTOS, B. V. O., LIRA, D. P.; SOUSA, J. C. F.; MIRANDA, G. E. C.;

CAVALCANTE, F. A.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S. Spasmolytic Effect of Caulerpine involves blockade of Ca^{2+} influx on guinea pig ileum. **Marine Drugs**, v. 11, n. 5, p. 1553–1564, 2013.

CHAO, C. H.; WEN, Z. H.; WU, Y. C.; YEH, H. C.; SHEU, J. H. Cytotoxic and anti-inflammatory cembranoids from the soft coral *Lobophytum crassum*. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 11, p. 1819–1824, 2008.

CHRISTENSEN J. The motility of the colon. In: JOHNSON LR, ed. **Physiology of the Gastrointestinal Tract**, 3^o ed. Raven Press, New York, p. 991-1024, 1994.

CONCEIÇÃO, M. M.; CANDEIA, R. A.; DANTAS, H. J.; SOLEDADE, L. E. B.; FERNANDES, V. J.; SOUZA, A. G. Rheological behavior of castor oil biodiesel. **Energy & Fuels**, v. 19, p. 2185-2188, 2005.

CONTE-CAMERINO, D.; LOGRANO, M. D.; DE LUCIA, A.; PERSICHELLA, M.; FRANCONI, F. The effects of the calcium channel agonist, Bay K-8644, on guinea-pig ileum and rat uterine horn. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 39, p. 954-957, 1987.

COOKE, H. J. Neurotransmitters in neuronal reflexes regulating intestinal secretion. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 915, p. 77–80, 2000.

CORREIA, A. C. C. **Estudo Comparativo da atividade espasmolítica de óleos essenciais de espécies de Annonaceae: *Rollinia leptopetala* R. E. Fries, *Xylopia langsdorfiana* A. St.-Hil. & Tul. e *Xylopia frutescens* Aubl.** 2013. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

COSTA-LOTUFO, L. V.; WILKE, D. V.; JIMENEZ, P. C.; EPIFANIO, R. A. Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: histórico & perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 703-716, 2009.

COURTOIS, A.; SIMON-COLIN, C.; BOISSET, C.; BERTHOU, C.; DESLANDES, E.; GUÉZENNEC, J.; BORDRON, A. Floridoside extracted from the red alga *Mastocarpus*

stellatus is a potent activator of the classical complement pathway. **Marine Drugs**, v. 6, p. 407-417, 2008.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013.

DANIEL, E. E.; KWAN, C. Y.; JANSSEN, L. Pharmacological techniques for the *in vitro* study of intestinal smooth muscle. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 45, p. 141-158, 2001.

DANILA, C. I.; HAMILTON, S. L. Phosphorylation of ryanodine receptors. **Biological Research**, v. 37, n. 4, p. 521-525, 2004.

DANTAS R. O. Diarrhea and constipation. **Medicina**, v. 37, p. 262-266, 2004.

D'AURIA, M. V.; D'AURIA, M. V.; SEPE, V.; D'ORSI, R.; BELLOTTA, F. Isolation and structural elucidation of callipeltins J-M: antifungal peptides from the marine sponge *Latrunculia* sp. **Tetrahedron**, v. 63, p. 131-140, 2007.

DIEZ-SAMPEDRO, A.; LOSTAO, M. P.; WRIGHT, E. M.; HIRAYAMA, B. A. Glycoside binding and translocation in Na⁺-dependent glucose cotransporters: comparison of SGLT1 and SGLT3. **Journal of Membrane Biology**, v. 176, p. 111-117, 2000.

DONALDSON, J.; HILL, S. J. Histamine-induced hydrolysis of polyphosphoinositides in guinea-pig ileum and brain. **European Journal of Pharmacology**, v. 124, p. 255-265, 1986.

DUTTA, K.; CARMODY, M. W.; CALA, S. E.; DAVIDORFF, A. J. Depressed PKA activity contributes to impaired SERCA function and is linked to the pathogenesis of glucose-induced cardiomyopathy. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 34, n. 8, p. 985-996, 2002.

DY, M.; SCHNEIDER, E. Histamine-cytokine connection in immunity and hematopoiesis. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 15, p. 393-410, 2004.

EDER, C.; SCHUPP, P.; PROKSCH, P.; WRAY, V.; STEUBE, K.; MÜLLER, C. E.; FROBENIUS, W.; HERDERICH, M.; VAN SOEST, R. W. Bioactive pyridoacridine alkaloids from the Micronesian sponge *Oceanapia* sp. **Journal of Natural Products**, v. 61, n. 2, p. 301-305, 1998.

EGLIN, R. M. Muscarinic receptors and gastrointestinal tract smooth muscle function. **Life Sciences**, v. 23, p. 2573–8, 2001.

EHLERT, F. J. Contractile role of M₂ and M₃ muscarinic receptors in gastrointestinal, airway and urinary bladder smooth muscle. **Life Sciences**, v. 74, p. 355-366, 2003.

EHLERT, F. J., ANSARI, K. Z., SHEHNAZ, D., SAWYER, G. W., & GRIFFIN, M. T. Acetylcholine-induced desensitization of muscarinic contractile response in guinea pig ileum is inhibited by pertussis toxin treatment. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 299, p. 1126-1132, 2001.

EHLERT, F. J.; THOMAS, E. A. Functional role of M₂ muscarinic receptors in the guinea pig ileum. **Life Sciences**, v. 56, p. 965-971, 1995.

ENGEL, G.; HOYER, D.; KALKMAN, H. O.; & WICK, M. B. Identification of 5HT₂-receptors on longitudinal muscle of the guinea pig ileum. **Journal of Receptor Research**, v. 4, n. 1-6, p. 113-126, 1984.

FAULKNER, D.J. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 19, p. 1-48, 2002.

FEHER, J. Smooth Muscle. **Quantitative Human Physiology**, p. 283-293, 2012.

FEHER, M.; SCHMIDT, J. M. Property distributions: differences between drugs, natural products, and molecules from combinatorial chemistry. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 43, p. 218-227, 2003.

FELDMAN, M.; FRIEDMAN, L. S.; BRANDT, L. J. Sleisenger and Fordtran's. gastrointestinal and liver disease, v. 9, p. 217, 2010.

FERNÁNDEZ-BAÑARES, F.; ACCARINO, A.; BALBOA, A.; DOMÈNECH, E.; ESTEVE, M.; GARCIA-PLANELLA, E.; GUARDIOLA, J.; MOLERO X.; RODRÍGUEZ-

LUNA, A.; RUIZ-CERULLA, A.; SANTOS, J.; VAQUERO, E. Chronic diarrhoea: Definition, classification and diagnosis. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 39, n. 01, p. S0210-5705, 2015.

FERRANTE, J.; LUCHOWSKI, E.; RUTLEDGE, A.; TRIGGLE, D.J. Binding of a 1,4-dihydropyridine calcium channel activator, S-(-)-Bay K8644, to cardiac preparations. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 158, p. 149-154, 1989.

FERREIRA, S. R. D. **A fração de glicoalcaloides totais de *Solanum crinitum* Lam. (Solanaceae) apresenta atividades antidiarreica e antiespasmódica.** 2016. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Farmácia) – Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

FIELD, M.; SEMRAD, C. E. Toxigenic diarrheas, congenital diarrheas, and cystic fibrosis: Disorders of intestinal ion transport. **Annual Review of Physiology**, v. 55, p. 631-655, 1993.

FINE, K. D. Diarrhea. In: FELDMAN, M.; SCHARSCHMIDT, B. F.; SLEISENGER, M. H. **Gastrointestinal and liver disease**, 6º ed. WB Saunders Company, Philadelphia, p. 128-152, 1998.

FINE, K. D.; ESCHILLER, L. R. American Gastroenterological Association medical position statement: guidelines for the evaluation and management of chronic diarrhea. AGA technical review on the evaluation and management of chronic diarrhea. **Gastroenterology**, v. 116, p. 1461-1486, 1999.

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. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 270, p. 1239-1235, 1994.

GAGINELLA, T. S.; BASS, P. Laxatives: an update on mechanism of action. **Life Sciences**, v. 23, p. 1001-1010, 1978.

GALE, J. D. The use of novel promotility and prosecretory agents for the treatment of chronic idiopathic constipation and irritable bowel syndrome with constipation. **Advances in Therapy**, v. 26, n. 5, p. 519-530, 2009.

GARRET, R. H.; GRISHAM, C. M. Muscle contraction. In: **Molecular Aspects of Cell Biology**, p. 1156-1179, 1995.

GELBMANN, C. M.; MESTERMANN, S.; GROSS, V. Structures in Crohn's disease are characterized by na accumulation of mast cells colocalised with laminin but not fibronectin or vitronectin. **Gut**, v. 45, p. 210–7, 1999.

GHAYUR, M. N.; GILANI, A. H. Pharmacological basis for the medicinal use of ginger in gastrointestinal disorders. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 50, n. 10, p. 1889-1897, 2005.

GILANI, A. H.; AZIZ, N.; KHURRAM, I. M.; RAO, Z. A.; ALI, N. K. The presence of cholinomimetic and calcium channel antagonist constituents in Piper betle Linn. **Phytotherapy Research**, v. 14, n. 6, p. 436-442, 2000.

GILANI, A. H.; GHAYUR, M. N.; HOUGHTON, P. J. Species differences in the gut stimulatory effects of radish seeds. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 57, n. 11, p. 1493-1501, 2005.

GILANI, A.H. Trends in ethnopharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 43–49, 2005.

GRINDBERG, R. V.; SHUMAN, C. F.; SORRELS, C. M.; WINGERD, J.; GERWICK, W. H. Neurotoxic Alkaloids from Cyanobacteria. In *Modern Alkaloids, Structure, Isolation, Synthesis and Biology*, E. Fattorusso and O. Taglialatela-Scafati, eds., p. 139–170, 2008.

GUO, H.; ZHANG, J.; GAO, W.; Qu, Z.; LIU, C.; Anti-diarrhoeal activity of methanol extract of *Santalum album* L. in mice and gastrointestinal effect on the contraction of isolated jejunum in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 154, p. 704-710, 2014.

GURGEL, L. A.; SILVA, R. M.; SANTOS, F. A.; MARTINS, T. O.; MATTOS, P. O.; RAO, V. S. N. Studies on the antidiarrhoeal effects of dragons blood from *Croton urucurana*. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 4, p. 319-322, 2001.

GUTIERREZ, R. M. P.; MITCHELL, S.; SOLIS, R. V. *Psidium guajava*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 117, p. 1–27, 2008.

GUTIERREZ, R. M. P.; VICTORIA, T. C.; FLORES, J. M. M. Sesquiterpene lactones: antispasmodic principles of the freshwater algae *Hydrodictyon reticulatum*. **Medicinal Chemistry Research**, v. 21, p. 1023-1029, 2012.

GUZII, A. G.; MAKARIEVA, T. N.; DENISENKO, V. A.; SVETASHEV, V. I.; RODKINA, S. A.; DMITRENOK, P. S.; ANASTYUK, S. D.; STONIK, V. New cerebrosides from the marine sponge *Oceanapia sp.* **Russian chemical bulletin**, v. 55, n. 5, p. 928-933, 2006.

HARRINGTON, A. M.; PECK, C. J.; LIU, L.; BURCHER, E.; HUTSON, J. M.; SOUTHWELL, B. R. Localization of muscarinic receptors M1R, M2R and M3R in the human colon. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 22, n. 9, p. 999-1008, 2010.

HASSAN-GILANI, A. U.; AZIZ, N.; AHMAD, M.; ALAM, M. T.; RIZWANI, G. H. Spasmogenic and spasmolytic constituents in *Sida pakistanica*. **Pharmaceutical Biology**, v. 37, n. 3, p. 173-180, 1999.

HENKEL, T.; BRUNNE, R. M.; MULLER, H.; REICHEL, F. Statistical investigation into the structural complementarity of natural products and synthetic compounds. **Angewandte Chemie International**, v. 38, p. 643-647, 1999.

HENTSCHEL, U.; HOPKE, J.; HORN, M.; FRIEDRICH, A. B.; WAGNER, M.; HACKER, J.; MOORE, B. S. Molecular evidence for a uniform microbial community in sponges from different oceans. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 4431–4440, 2002.

HILL, S. J. Distribution, properties and functional characteristics of three classes of histamine receptor. **Pharmacological Reviews**, v. 42, p. 45–83, 1990.

HILL, S. J.; GANELLIN, C. R., TIMMERMAN, H., SCHWARTZ, J. C., SHANKLEY, N. P., YOUNG, J. M., SCHUNACK, W.; LEVI, R.; HAAS, H. L. International Union of Pharmacology. XIII. Classification of histamine receptors. **Pharmacological Reviews**, v. 49, p. 253-278, 1997.

HILL-EUBANKS, D. C.; WERNER, M. E.; HEPPNER, T. J.; NELSON, M. T. Calcium signaling in smooth muscle. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 27, p. 1-21, 2011.

HOLTZ, L. R.; NEILL, M. A.; TARR, P. I. Acute bloody diarrhea: a medical emergency for patients of all ages. **Gastroenterology**, v. 136, p. 1887–1898, 2009.

HONDA, K.; TAKANO, Y.; KAMIYA, H. Involvement of protein kinase C in muscarinic agonist-induced contractions of guinea pig ileal longitudinal muscle. **General Pharmacology**, v. 27, n. 6, p. 957-961, 1996.

HOOPER, J. N. Sponguide. Guide to sponge collection and identification; **Queensland Museum**: Queensland, Australia, 2000.

HORI, M.; KARAKI, H. Regulatory mechanisms of calcium sensitization of contractile elements in smooth muscle. **Life Science**, v. 62, p. 1689–1633, 1998.

HORIE, S.; TSUTSUMI, S.; TAKADA, Y.; KIMURA, J. Antibacterial quinone metabolite from the brown alga, *Sargassum sagamianum*. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 81, p. 1125-1130, 2008.

HU, G. P.; YUAN, J.; SUN, L.; SHE, Z. G.; WU, J. H.; LAN, X. J.; ZHU, X.; LIN, Y. C.; CHEN, S. P. Statistical research on marine natural products based on data obtained between 1985 and 2008. **Marine Drugs**, v. 9, p. 514–525, 2011.

HULME, E. C. Muscarinic acetylcholine receptors: typical G-coupled receptors. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, v. 44, p. 39–54, 1990.

IBRAHIM, S. R.; MOHAMED, G. A.; ELKHAYAT, E. S.; FOUAD, M. A.; PROKSCH, P. Sagitol C, a new cytotoxic pyridoacridine alkaloid from the sponge *Oceanapia* sp. **Bulletin of Faculty of Pharmacy**, v. 51, n. 2, p. 229-232, 2013.

IZZO, A. A.; MASCOLO, N.; CAPASSCO, R.; GERMANO, M. P.; DE PASUELE, R.; CASPASSCO, F. Inhibitory effect of cannabinoid agonists on gastric emptying in rat. **Archives of Pharmacology**, v. 360, p. 221–223, 1999.

JIM, K.; HARRIS, A., ROSENBERGER L. B.; TRIGGLE, D. J. Stereoselective and non-sterenselective effects of D 600 (Methoxyverapamil) in smooth muscle. **European Journal of Pharmacology**, v. 76,p. 67-72, 1981.

JIMÉNEZ, J.; MARFIL, M.; FRANCESCH, A.; CUEVAS, C.; ALVAREZ, M. Y ALBERICIO, F. 2007. Productos naturales de origen marino. **Investigación y Ciencia**, v. 365, p. 75-83, 2007.

JUÁREZ-OROPEZA, M. A.; MASCHER, D.; TORRES-DURÁN, P. V.; FARIAS, J. M.; PAREDES-CARBAJAL, M. C. Effects of dietary *Spirulina* on vascular reactivity. **Journal of Medicinal Food**, v. 12. n. 1, p. 15-20, 2009.

JUNG, W. K.; JO, H. Y.; QIAN, Z. J.; JEONG, Y. J.; PARK, S. G.; CHOI, I. W.; KIM, S. K. A novel anticoagulant protein with high affinity to blood coagulation factor Va from *Tegillarca granosa*. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 40, p. 832-838, 2007.

KADLEC, O.; RADOMIROV, R. Effects of prostaglandins F2 α and E1 on the longitudinal and circular smooth muscle of the guinea pig caecum in relation to the concentration of extracellular calcium. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 288, n. 4, p. 335-343, 1975.

KARAKI, H.; OZAKI, H.; HORI, M.; MITSUI-SAITO, M.; AMANO, K. I.; HARADA, K. I.; MIYAMOTO, S.; NAKAZAWA, H.; WON, K. J.; SATO, K. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. **Pharmacological Reviews**, v. 49, n. 2, p. 157-230, 1997.

KERR, P. M.; HILLIER, K.; WALLIS, R. M.; GARLAND, C. J. Characterization of muscarinic receptors mediating contractions of circular and longitudinal muscle of human isolated colon. **British Journal of Pharmacology**, v. 115, p. 1518–24, 1995.

KEUSCH, G. T. Toxin-Associated Gastrointestinal Disease: A Clinical Overview. In **Molecular Medical Microbiology**, p. 1083–88, 2001.

KIJJOA, A.; WATTANADILOK, R.; CAMPOS, N.; NASCIMENTO, M. S. J.; PINTO, M.; HERZ, W. Anticancer activity evaluation of kuanoniamines A and C isolated from the marine sponge *Oceanapia sagittaria*, collected from the gulf of Thailand. **Marine Drugs**, v. 5, n. 2, p. 6-22, 2007.

KIM, H. R.; APPEL, S.; VETTERKIND, S.; GANGOPADHYAY, S. S.; MORGAN, K. G. Smooth muscle signalling pathways in health and disease. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 12, n. 6a, p. 2165-2180, 2008.

KIM, H.; DWYER, L.; SONG, J. H.; MARTIN-CANO, F. E.; BAHNEY, J.; PERI, L.; BRITTON, F. C.; SANDERS, K. M.; KOH, S. D. Identification of histamine receptors and effects of histamine on murine and simian colonic excitability. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 23, n. 10, p. 949-e409, 2011.

KIMURA, K.; ITO, M.; AMANO, M.; CHIHARA, K.; FUKATA, Y.; NAKAFUKU, M. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). **Science**, v. 273, p. 254 – 248, 1996.

KNOT, H. T.; BRAYDEN, E. J.; NELSON, M. T. Calcium channels and potassium channels. In BÁRÁNY, M. Biochemistry of smooth muscle contraction, San Diego, **Academic Press**, p. 203-219, 1996.

KOBAYASHI, S.; KITAZAWA, T.; SOMLYO, A. V.; SOMLYO, A. P. Cytosolic heparin inhibits muscarinic and α -adrenergic Ca^{2+} -release in smooth muscle: physiological role of inositol 1,4,5-trisphosphate in pharmacomechanical coupling. **Journal Biological Chemistry**, v. 264, p. 17997-18004, 1989.

KURIYAMA, H.; KITAMURA, K.; NABATA, H. Pharmacological and physiological significance of ion channels and factors that modulate them in vascular tissues. **Pharmacological Reviews**, v. 47, n. 3, p. 387-573, 1995.

LAPORT, M.; SANTOS, O.; MURICY, G. Marine sponges: Potential sources of new antimicrobial drugs. **Current Pharmaceutical Biotechnology**. v. 10, p. 86–105, 2009.

LEE, K. J. Pharmacologic agents for chronic diarrhea. **Intestinal Research**, v. 13, n. 4, p. 306-312, 2015.

LEVEY, A. I. Immunological localization of m1-m5 muscarinic acetylcholine receptors in peripheral tissues and brain. **Life Sciences**, v. 6, p. 441–8, 1993.

LI, C.-W.; Chen, J. Y.; Hua, T. E. Precambrian sponges with cellular structures. **Science**, v. 279, p. 879–882, 1998.

LI, J.; DAI, Z.; JANA, D.; CALLAWAY, D. J.; BU, Z. Ezrin controls the macromolecular complexes formed between an adapter protein Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor and the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 37634-37643, 2005.

LIM, Y. L.; MOK, S. L. In vitro vascular effects produced by crude aqueous extract of green marine algae, *Cladophora patentiramea* (Mont.) Kützing, in aorta from normotensive rats. **Medical Principles and Practice**, v. 19, p. 260-268, 2010.

LIU, C.; WILSON, S. J.; KUEI, C.; LOVENBERG, T. W. Comparison of human, mouse and guinea pig histamine H4 receptors reveals substantial pharmacological species variation. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 299, p. 121–30, 2001.

LIU, L.; JOHNSON, H. L.; COUSENS, S.; PERIN, J.; SCOTT, S.; LAWN, J. E.; RUDAN, I.; CAMPBELL, H.; CIBULSKIS, R.; LI, M.; MATHERS, C.; BLACK, R. E.; Child Health Epidemiology Reference Group of WHO and UNICEF, 2012. Global, regional, and national causes of child mortality: na updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. **Lancet**, v. 379, n. 9832, p. 2151–2161, 2012.

LOCKE, G. R.; PEMBERTON, J. H.; PHILLIPS, S. F. American gastroenterological association medical position statement: guidelines on constipation. AGA technical review on constipation. **Gastroenterology**, v. 119, p. 1761-1778, 2005.

MAKARIEVA, T. N.; DENISENKO, V. A.; DMITRENOK, P. S.; GUZII, A. G.; SANTALOVA, E. A.; STONIK, V. A.; MACMILLAN, J. B.; MOLINSKI, T. F. Oceanalin A, a hybrid alpha,omega-bifunctionalized sphingoid tetrahydroisoquinoline

beta-glycoside from the marine sponge *Oceanapia* sp. **Organic Letters**, v. 7, n. 14, p. 2897-900, 2005.

MAKONNEN, E. Constipating and spasmolytic effects of khat (*Catha edulis* Forsk) in experimental animals. **Phytomedicine**, v. 7, n. 4, p. 309-312, 2000.

MANATSATHIT S; DUPONT H. L.; FARTHING M.; KOSITCHAIWAT C.; LEELAKUSOLVONG S.; RAMAKRISHNA B. S.; SABRA A.; SPEELMAN P.; SURANGSRIRAT S. Guideline for the management of acute diarrhea in adults. **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 17, n. s1, p. S54-S71, 2002.

MANCINI, I.; GUELLA, G.; SAUVAIN, M.; DEBITUS, C.; DUIGOU, A. G.; AUSSEIL, F.; MENOU, J. L.; PIETRA, F. New 1,2,3,4-tetrahydropyrrolo[1,2-a]pyrimidinium alkaloids (phloeodictynes) from the New Caledonian shallow-water haplosclerid sponge *Oceanapia fistulosa*. Structural elucidation from mainly LC-tandem-MS-soft-ionization techniques and discovery of antiplasmodial activity. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 2, p. 783-7, 2004.

MARD, S. A.; VEISI, A.; NASERI, M. K. G.; MIKAILI, P. Spasmogenic Activity of the Seed of *Terminalia chebula* Retz in Rat Small Intestine: *in vivo* and *in vitro* studies. 2013.

MATSUNAGA, S.; OKADA, Y.; FUSEYANI, N.; & VAN SOEST, R. W. An antimicrobial C14 acetylenic acid from a marine sponge *Oceanapia* Species 1. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 5, p. 690-691, 2000.

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

MEHBU, G. P.; YUAN, J.; SUN, L.; SHE, Z. G.; WU, J. H.; LAN, X. J.; ZHU, X.; LIN, Y. C.; CHEN, S. P. Statistical research on marine natural products based on data obtained between 1985 and 2008. **Marine Drugs**, v. 9, p. 514–525, 2011.

MEHMOOD, M. H.; AL-REHAILY, A. J.; MOTHANA, R. A.; GILANI, A. H. Species and tissue-specificity of prokinetic, laxative and spasmodic effects of *Fumaria parviflora*. *BMC complementary and alternative medicine*, v. 12, n. 1, p. 16, 2012.

MEHMOOD, M. H.; ANILA, N.; BEGUM, S.; SYED, S. A.; SIDDIQUI, B. S.; GILANI, A. H. Pharmacological basis for the medicinal use of *Carissa carandas* in constipation and diarrhea. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 153, n. 2, p. 359-367, 2014.

MEHMOOD, M. H.; AZIZ, N.; GHAYUR, M. N.; GILANI, A. H. Pharmacological basis for the medicinal use of *Psyllium husk* (Ispaghula) in constipation and diarrhea. *Digestive Diseases and Sciences*, v. 56, n. 5, p. 1460-1471, 2011.

MENÉNDEZ, J. Nuevos antitumorales de origen marino. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, v. 71, n. 2, p. 341-363, 2005.

MOLINSKI, T. F.; DALISAY, D. S.; LIEVENS, S. L.; SALUDES, J. P. Drug development from marine natural products. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 8, p. 69-85, 2009.

MOON, C.; ZHANG, W.; SUNDARAM, N.; YARLAGADDA, S.; REDDY, V. S.; ARORA, K.; HELMRATH M. A.; NAREN A. P. Drug-induced secretory diarrhea: A role for CFTR. *Pharmacological Research*, v. 102, p. 107-12, 2015.

MORA-CRISTANCHO, J.; ZEA, S.; SANTOS-ACEVEDO, M.; NEWMARK-UMBREIT, F. Capacidad antimotilitica de extractos de esponjas marinas del Caribe colombiano. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras*, v. 36, p. 167-179, 2007.

MORA-PALE, M.; SANCHEZ-RODRIGUEZ, S.; LINHARDT, R. J.; DORDICK, J. S.; KOFFAS, M. A. G. Biochemical strategies for enhancing the in vivo production of natural products with pharmaceutical potential. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 25, p. 86-94, 2014.

MOREL, N.; HARDY, J. P.; GODFRAIND, T. Histamine-operated calcium channels in intestinal smooth muscle of the guinea-pig. *European Journal of Pharmacology*, v. 135, p. 69-75, 1987.

MOVAHHEDIN, N.; BARAR, J.; FATHI AZAD, F.; BARZEGARI, A.; NAZEMIYEH, H. Phytochemistry and biologic activities of *Caulerpa Peltata* native to oman sea. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 2, p. 515-521, 2014.

MURICY, G.; HAJDU, E.; ARAUJO, F. V.; HAGLER, A. N. Antimicrobial activity of Southwestern Atlantic shallow-water marine sponges (Porifera). **Scientia Marina**, v. 57, n. 4, p. 427-432, 1993.

MURTHY, K. S. Signaling for contraction and relaxation in smooth muscle of the gut. **Annual Review of Physiology**, v. 68, n. 1, p. 345-374, 2006.

MURTHY, M. E.; BRAYDEN, J. E. Nitric oxide hyperpolarizes rabbit mesenteric arteries via ATP-sensitive potassium channel. **Journal of Physiology**, v. 486, p. 47-58, 1995.

NICE (National Institute for Health and Care Excellence). **Irritable bowel syndrome in adults: diagnosis and management of irritable bowel syndrome in primary care**. 2008. Disponível em: <http://guidance.nice.org.uk/CG61>, acesso em: 12 de janeiro de 2016.

NICHOLAS, G. M.; HONG, T. W.; MOLINSKI, T. F.; LERCH, M. L.; CANCELLA, M. T.; LEBRILLA, C. B. Oceanapiside, an antifungal bis-alpha,omega-amino alcohol glycoside from the marine sponge *Oceanapia phillipensis*. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 12, p. 1678-81, 1999.

ODA, T.; MORIKAWA, N.; SAITO, Y.; MASUHO, Y.; MATSUMOTO, S. Molecular cloning and characterization of a novel type of histamine receptor preferentially expressed in leukocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 36781–86, 2000.

OECD. Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method. **OECD guideline for testing of chemicals** n. 423, 2001.

OGBOURNE, S. M.; PARSONS, P. G. The value of nature's natural product library for the discovery of New Chemical Entities: The discovery of ingenol mebutate. **Fitoterapia**, v. 98, p. 36-44, 2014.

OGUT, O.; BROZOVICH, F. V. Regulation of force in vascular smooth muscle. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 35, p. 347–355, 2003.

OLIVEIRA, T. C.; LATORRE, M. R. D.O. Trends in hospital admission and infant mortality from diarrhea: Brazil, 1995-2005. **Revista de Saúde Pública**, v. 44, n. 1, p. 102-11, 2010.

PALLA, A. H.; GILANI, A. H. Dual effectiveness of Flaxseed in constipation and diarrhea: Possible mechanism. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 169, p. 60-68, 2015.

PAN, S. Y.; LITSCHER, G.; GAO, S. H.; ZHOU, S. F.; YU, Z. L.; CHEN, H. Q.; ZHANG, S. F.; TANG, M. K.; SUN, J. N.; KO, K. M. Historical perspective of traditional indigenous medical practices: the current renaissance and conservation of herbal resources. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1-20, 2014.

PARASHAR, U. D.; BRESEE, J. S.; GLASS, R. I. The global burden of diarrhoeal disease in children. **Bull World Health Organ**, vol.81, p. 236, 2003.

PASRICHA, P. J. Treatment of disorders of bowel motility and water flux; antiemetics; agents used in biliary and pancreatic disease. **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 11th ed. New York: McGraw-Hill, p. 983-1008, 2006.

PEREIRA, V. V.; CABRAL, I. E. Diarréia aguda em crianças menores de um ano: subsídios para o delineamento do cuidar. **Escola Anna Nery Revista de Enfermagem**, v. 12, p. 224-229, 2008.

PERUSQUÍA, M.; HERÁNDEZ, R.; JIMÉNEZ, M. A.; PEREDA-MIRANDA, R.; MATA, R. Contractile response induced by a limonoid (humilinolide A) on spontaneous activity of isolated smooth muscle. **Phytotherapy Research**, v. 11, n. 5, p. 354-357, 1997.

PUETZ, S.; LUBOMIROV, L. T.; PFITZER, G. Regulation of smooth muscle contraction by small GTPases. **Physiology**, v. 24, p. 342-356, 2009.

QUEIROZ, T. M.; MACHADO, N. T.; FURTADO, F. F.; OLIVEIRA-FILHO, A. A.; ALUSTAU, M. C.; FIGUEIREDO, C. S.; MIRANDA, G. E. C.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BRAGA, V. A.; MEDEIROS, I. A. Vasorelaxation, induced by *Dictyota pulchella* (Dictyotaceae), a brown alga, is mediated via inhibition of calcium influx in rats. **Marine Drugs**, v. 9, p. 2075-2088, 2011.

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 viscosae*. **Planta Médica**, v. 63, p. 146-149, 1997.

RAY, G. Y.; GRASSELE, J. Marine biological diversity. **Bioscience**, v. 41, p. 453-461, 1991.

DE LA CALLE, F. Fármacos de origen marino. **Treballs de la Societat Catalana de Biologia**, v.58, p. 141-155, 2007.

REISWIG, H. Water transport, respiration and energetics of three tropical marine sponges. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 14, p. 231-249, 1974.

REMBOLD, C. M. Electromechanical and pharmacomechanical coupling. In: Bárány; M. **Biochemistry of Smooth Contraction**. San Diego, Academic Press, p. 227-239, 1996.

RICCIONI, G.; D'ORAZIO, N.; FRANCESCHELLI, S.; SPERANZA, L. Marine carotenoids and cardiovascular risk markers. **Marine Drugs**, v. 9, p. 1166-1175, 2011.

RICHARDS, I. S.; BOURGEOIS, M. Red tide toxin produces in vitro depolarization of human airway smooth muscle. **Clinical toxicology**, v.48, p. 121-3, 2010.

RIJNIERSE, A.; NIJKAMP, F. P.; KRANEVELD, A. D. Mast cells and nerves tickle in the tummy. Implications for inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 116, p. 207-35, 2007.

ROUF, A. S.; ISLAM, M. S.; RAHMAN, M. T. Evaluation of antidiarrhoeal activity *Rumex maritimus* root. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 84, p. 307-310, 2003.

SABINO-SILVA, R.; MORI, R. C.; DAVID-SILVA, A.; OKAMOTO, M. M.; FREITAS, H. S.; MACHADO, U. F. The Na⁺/glucose cotransporters: from genes to therapy. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, n. 11, p. 1019-1026, 2010.

SÁEZ, J.; CIFUENTES, L. Is racecadotril effective for acute diarrhea in children? **Medwave**, v. 15(Suppl 3), p. e6339, 2015.

SANDER, L. E.; LORENTZ, A.; SELLGE, G.; COEFFIER, M.; NEIPP, M.; VERES, T.; FRIELING, T.; MEIER, P. N.; MANNS, M. P; BISCHOFF, S. C. Selective expression of histamine receptors H1R, H2R, and H4R, but not H3R, in the human intestinal tract. **Neurogastroenterology**, v. 55, p. 498–504, 2006.

SAWYER, G. W.; EHLERT, F. J. Muscarinic M₃ receptor inactivation reveals a pertussis toxin-sensitive contractile response in the guinea pig colon. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 289, p. 464-76, 1999.

SHMIGOL, A.; EISNER, D. A.; WRAY, S. Properties of voltage-activated [Ca²⁺] transients in single smooth muscle cells isolated from pregnant rat uterus. **Journal of Physiology**, v. 511, p. 803–811, 1998.

SINGH, K. S.; DAS, B.; NAIK, C. G. Quinolizidines alkaloids: Petrosin and xestospongins from the sponge *Oceanapia* sp. **Journal of Chemical Sciences**, v.123, n. 5, p. 601-607, 2011.

SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Signal transduction and regulation in smooth muscle. **Nature**, v. 372, n. 6503, p. 231-236, 1994.

SOMLYO, A. P; SOMLYO, A. V. Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. **Physiological Reviews**, v. 83, p. 1325-1358, 2003.

SOUZA, I. L. L. **A ação espasmolítica do óleo essencial de *Xylopia frutescens* Aubl. envolve a redução dos níveis citosólicos de cálcio em íleo de cobaia.** 2014. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

SPEDDING, M.; PAOLETTI, R. Classification of calcium channels and the sites of action of drugs modifying channel function. **Pharmacology Reviews**, v. 44, p. 363- 376, 1992.

STANEVA-STOYTCHIEVA, D.; VENKOVA, K. Effects of the calcium antagonists diltiazem, verapamil and nitrendipine on the contractile responses of guinea-pig isolated ileum to electrical stimulation or carbachol. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 44, p. 321-325, 1992.

STEAD, P.; HISCOX, S.; ROBINSON, P. S.; PIKE, N. B.; SIDEBOTTOM, P. J.; ROBERTS, A. D.; TAYLOR, N. L.; WRIGHT, A. E.; POMPONIS, S. A.; LANGLEY, D. Eryloside F, a novel penasterol disaccharide possessing potent thrombin receptor antagonist activity. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 10, n. 7, p. 661–664, 2000.

SUN, Y. D.; BENISHIN, C. G. K⁺ channel openers relax longitudinal muscle of guinea-pig ileum. **European Journal of Pharmacology**, v. 271, p. 453-459, 1994.

SUZUKI, M.; VAIRAPPAN, C.S. Halogenated secondary metabolites from Japanese species of the red algal genus *Laurencia* (Rhodomelaceae, Ceramiales). **Current Topics in Phytochemistry**, v. 7, p. 1–34, 2005.

THOMAS, E. A.; EHLERT, F. J. Pertussis toxin blocks M₂ muscarinic receptor-mediated effects on contraction and cyclic AMP in the guinea pig ileum, but not M₃-mediated contractions and phosphoinositide hydrolysis. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 271, 1042-1050, 1994.

TOMITA, T. Electrical activity (spikes and slow waves) in gastrointestinal smooth muscles. **Smooth Muscle: An assessment of Current Knowledge**, p. 127-156, 1981.

TREVISI, L.; CARGNELLI, G.; CELOTTI, G.; PAPPARELLA, I.; SEMPLICINI, A.; ZAMPELLA, A.; D'AURIA, M. V.; LUCIANI, S. Callipeltin A: sodium ionophore effect and tension development in vascular smooth muscle. **Biochemical Pharmacology**, v. 68, n. 7, p. 1331-1338, 2004.

TRIGGLE, C. R.; SWAMY, V. C.; TRIGGLE, D. J. Calcium antagonists and contractile responses in rat vas deferens and guinea pig ileal smooth muscle. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 57, p. 804-818, 1979.

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

VAN ROSSUM, J. M. Cumulative dose-response curves. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie**, v. 143, p. 299-330, 1963.

VAN SOEST, R.; BOURY-ESNAULT, N.; HOOPER, J.; RÜTZLER, K.; DE VOOGLD, N.; ALVAREZ DE GLASBY, B.; HAJDU, E.; PISERA, A.; MANCONI, R.; SCHOENBERG, C. World Porifera Database. **The World Register of Marine Species (WoRMS)**. Disponível em: <http://www.marinespecies.org/porifera>, acesso em: 16/05/2015.

VENKATESAN, N.; THIYAGARAJAN, V.; NARAYANAN, S.; ARUL, A.; RAJA, S.; KUMAR, S. G. V.; RAJARAJAN, T.; PERIANAYAGAM, J. B. Antidiarrhoeal potential of *Asparagus racemosus* wild root extracts in laboratory animals. **Journal of Pharmacy and Pharmacological Science**, v. 8, p. 39–45, 2005.

VIEGAS-JÚNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, p. 326-337, 2006.

VITALI, F.; FONTE, G.; SSAIJA, A.; TITA, B. Inhibition of intestinal motility and secretion by extracts of *Epilobium spp.* in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, p. 342-348, 2006.

WALJI, R.; WIKTOROWICZ, M. Governance of natural health products regulation: An iterative process. **Health Police**, v. 111, p. 86-94, 2013.

WANG, B.; DENG, J.; GAO, Y.; ZHU, L.; HE, R.; XU, Y. The screening toolbox of bioactive substances from natural products: A review. **Fitoterapia**, v. 8, p. 1141-1151, 2014.

WATERMAN, S. A. Voltage-gated calcium channels in autonomic neuroeffector transmission. **Progress in Neurobiology**, v. 60, n. 2, p. 181-210, 2000.

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

WEBB, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Advances in Physiology Education**, v. 27, p.201-206, 2003.

WIRTH, A.; OFFERMANN, S. G-Protein-Coupled Receptors in Smooth Muscle. **Muscle — Fundamental Biology and Mechanisms of Disease**, p. 1145-1153, 2012.

WOOD, I. S.; TRAYHURN, P. Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. **British Journal of Nutrition**, v. 89, p. 3-9, 2003.

WOOD, J. D. Histamine, mast cells, and the enteric nervous system in the irritable bowel syndrome, enteritis, and food allergies. **Neurogastroenterology**, v. 55, p. 445–447, 2006.

WOODRUM, D. A.; BROPHY, C. M. The paradox of smooth muscle physiology. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 177, n. 1-2, p. 135-143, 2001.

World Gastroenterology Organisation (WGO). Constipation: A Global Perspective. Disponível em: <http://www.worldgastroenterology.org/guidelines/global-guidelines/constipation>, acesso em 13 de janeiro de 2016.

World Health Organization (WHO). Diarrhoeal disease. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/en/>. Acesso em 13 de janeiro de 2016.

WRAY, S.; BURDYGA, T.; NOBLE, K. Calcium signalling in smooth muscle. **Cell Calcium**, v. 38, p. 397–407, 2005.

WRIGHT, E. M.; LOO, D. D.; HIRAYAMA, B. A.; TURK, E. Surprising versatility of Na⁺-glucose cotransporters: SLC5. **Physiology**, v. 19, p. 370-376, 2004.

YAKUBU, M. T., & SALIMON, S. S. Antidiarrhoeal activity of aqueous extract of *Mangifera indica* L. leaves in female albino rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 163, p. 135-141, 2015.

YAMADA, T.; MINOURA, K.; TANAKA, R.; NUMATA, A. Cell-adhesion inhibitors produced by sea hare-derived *Periconia* sp. III. Absolute stereostructures of peribysins J and macrosphelide M. **The Journal of Antibiotics**, v. 60, p. 370-375, 2007.

ZAMPELI, E.; TILIGADA, E. The role of histamine H4 receptor in immune and inflammatory disorders. **British Journal of Pharmacology**, v. 157, p. 24–33, 2009.

ZAVALA, M. A.; PÉREZ, S.; PÉREZ, C.; VARGAS, R.; PÉREZ, R. M. Antidiarrhoeal activity of *Waltheria americana*, *Commelina coelestis* and *Alternanthera repens*. **Journal of Etnofarmacology**, v. 61, p. 41-47, 1998.

ZEUTHEN, T.; MEINILD, A. K.; LOO, D. D.; WRIGHT, E. M.; KLAERKE, D. A. Isotonic transport by the Na⁺-glucose cotransporter SGLT1 from humans and rabbit. **Journal of Physiology**, v. 531, p. 631-644, 2001.

Apêndices

Apêndice 1 – Artigo publicado na revista Planta Médica (2015).

58 Original Papers

Toxicological, Antidiarrheal and Spasmolytic Activities of *Solanum paniculatum*

Authors

José Clementino-Neto¹, Joedna C. Pereira², Luiz H. C. Vasconcelos², Iara L. L. de Souza², Anne D. S. Silva³, Telma M. G. Silva⁴, Natalia S. M. Ramos⁴, Hilzeth L. F. Pessoa⁵, Tania M. S. Silva⁴, Bagnólia A. da Silva^{2,6}, Fabiana de A. Cavalcante^{2,7}

Affiliations

The affiliations are listed at the end of the article

Key words

- *Solanum paniculatum*
- Solanaceae
- toxicological activity
- antidiarrheal effect
- spasmolytic action

received March 17, 2015
revised July 10, 2015
accepted July 15, 2015

Bibliography

DOI <http://dx.doi.org/10.1055/s-0035-1557831>
Published online September 14, 2015
Planta Med 2016; 82: 58–64
© Georg Thieme Verlag KG
Stuttgart · New York ·
ISSN 0032-0943

Correspondence

Fabiana de A. Cavalcante
Laboratório de Farmacologia
Funcional
"Prof. George Thomas"
Programa de Pós-graduação em
Produtos Naturais e Sintéticos
Bioativos (PPgPNSB)
Instituto de Pesquisa de Fármacos
e Medicamentos (IpeFarM)
Universidade Federal da Paraíba
P.O. Box 5009
58051-970 João Pessoa, PB
Brazil
Phone: +55 83 32 1671 26
Fax: +55 83 32 1675 02
fabianacavalcante@lftf.ufpb.br

Abstract

Solanum paniculatum is popularly known as "jurubeba-verdadeira". In folk medicine, its roots, stems, and leaves are used as tonics, anti-inflammatories, carminatives, diuretics, and for gastrointestinal disorders. This species is listed in the Brazilian Pharmacopoeia and belongs to the "Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS". Based on folk medicine data of the *Solanum* genus, we decided to investigate whether the crude ethanol extract from *S. paniculatum* aerial parts presents toxicological, antidiarrheal, and spasmolytic activities. The crude ethanol extract from *S. paniculatum* aerial parts did not produce *in vitro* or *in vivo* toxicity and showed dose-dependent antidiarrheal activity, inhibiting equipotently both the defecation frequency ($ED_{50} = 340.3 \pm 35.1$ mg/kg) and liquid stool formation

($ED_{50} = 370.1 \pm 19.4$ mg/kg) in mice. Conversely, the crude ethanol extract from *S. paniculatum* aerial parts did not inhibit normal intestinal transit, even though it has shown a dose-dependent reduction of both the castor oil-induced intestinal transit ($E_{max} = 36.9 \pm 1.3\%$, $ED_{50} = 242.0 \pm 8.6$ mg/kg) and intestinal fluid content ($E_{max} = 74.8 \pm 2.4\%$, $ED_{50} = 328.9 \pm 15.9$ mg/kg). Additionally, the crude ethanol extract from *S. paniculatum* aerial parts was approximately 2-fold more potent in antagonizing the phasic contractions induced with histamine ($IC_{50} = 63.7 \pm 3.5$ µg/mL) than carbachol 10^{-6} M ($IC_{50} = 129.3 \pm 14.1$ µg/mL). Therefore, we concluded that the crude ethanol extract from *S. paniculatum* aerial parts presents antidiarrheal activity in mice related to the inhibition of small intestinal motility and secretion as well as nonselective spasmolytic activity on the guinea pig ileum.

Introduction

Diarrhea is one of the most common diseases and is characterized primarily by an increased number of evacuations (3 or more in 24 h), a decrease in the stool consistency, and the presence of blood and/or mucus that, in some cases, leads to hydro-electrolytic disorder [1]. Approximately 2 million children worldwide die due to diarrhea every year, making diarrhea the third most common cause of death in children younger than 5 years in poor countries [2]. An alternative strategy used against diarrhea is the use of natural products in special medicinal plants. Included in the Brazilian biodiversity, the *Solanum* genus is the most representative of the Solanaceae family with 260 species [3] and is characterized by the production of a variety of glycoalkaloids [4] and a high occurrence of flavonoids, alkaloids, and glycosides [5].

Some species of *Solanum* are used in folk medicine for diarrhea treatment, such as *S. dasyphyllum* Schumacher & Thonn [6], *Solanum marginatum* L.f. [7], *Solanum tuberosum* L. [8], and *Solanum sisymbriifolium* Lam. [9]. *Solanum paludosum* Moric. [10] and *Solanum asterophorum* Mart. [11] have shown antidiarrheal activity in mice. Additionally, there are evidences that some species exhibit spasmolytic activity on the guinea pig ileum, such as *Solanum megalonyx* Sendtner, *S. asterophorum* [12,13], *Solanum jabrense* Agra & Nee [14], and *Solanum agrarium* Sendtner [15]. *Solanum paniculatum* L. is a shrubby species popularly known as "jurubeba-verdadeira" [16]. Its roots, stems, and leaves are used as tonics, anti-inflammatories, carminatives, diuretics, and digestives in folk medicine [17–19]. Additionally, a decoction of the leaves is used to treat intestinal parasites and gastrointestinal disorders [20,21]. Furthermore, this species is listed in the Brazilian Pharmacopoeia for digestive disorders [22] and

Apêndice 2 – Artigo publicado na revista *Journal of Smooth Muscle Research* (2015).

J. Smooth Muscle Res. 2015; 51: 70–81
Published online: October 24, 2015; doi: 10.1540/jsmr.51.70

Original

Intensity of swimming exercise influences tracheal reactivity in rats

Aline F. Brito^{1,2,3}, Alexandre S. Silva³, Iara L. L. Souza^{1,2}, Joedna C. Pereira^{1,2}, Italo R. R. Martins^{1,2} and Bagnólia A. Silva^{1,2}

¹Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, Paraíba, Brasil

²Laboratório de Farmacologia Funcional Professor George Thomas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, Paraíba, Brasil

³Laboratório de Estudos do Treinamento Físico Aplicado ao Desempenho e saúde, Departamento de Educação Física (DEF), Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, Paraíba, Brasil

Submitted July 22, 2015; accepted in final form September 4, 2015

Abstract

Studies that evaluate the mechanisms for increased airway responsiveness are very sparse, although there are reports of exercise-induced bronchospasm. Therefore, we have evaluated the tracheal reactivity and the rate of lipid peroxidation after different intensities of swimming exercise in rats. Thus, male Wistar rats (age 8 weeks; 250–300 g) underwent a forced swimming exercise for 1h whilst carrying attached loads of 3, 4, 5, 6 and 8% of their body weight (groups G3, G4, G5, G6 and G8, respectively; $n=5$ each). Immediately after the test, the trachea of each rat was removed and suspended in an organ bath to evaluate contractile and relaxant responses. The rate of lipid peroxidation was estimated by measuring malondialdehyde levels. According to a one-way ANOVA, all trained groups showed a significant decrease in the relaxation induced by aminophylline (10^{-12} – 10^{-1} M) ($pD_2=3.1, 3.2, 3.3, 3.3$ and 3.2 , respectively for G3, G4, G5, G6 and G8) compared to the control group ($pD_2=4.6$) and the E_{max} values of G5, G6, G8 groups were reduced by 94.2, 88.0 and 77.0%, respectively. Additionally, all trained groups showed a significant increase in contraction induced by carbachol (10^{-9} – 10^{-3} M) ($pD_2=6.0, 6.5, 6.5, 7.2$ and 7.3 , respectively for G3, G4, G5, G6 and G8) compared to the control group ($pD_2=5.7$). Lipid peroxidation levels of G3, G4 and G5 were similar in both the trachea and lung, however G6 and G8 presented an increased peroxidation in the trachea. In conclusion, a single bout of swimming exercise acutely altered tracheal responsiveness in an intensity-related manner and the elevation in lipid peroxidation indicates a degree of oxidative stress involvement.

Key words: trachea, aerobic exercise, anaerobic exercise, lipid peroxidation

Apêndice 3 – Artigo publicado na revista *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* (2015).

Brazilian Journal of Medical and Biological Research (2015) 48(11): 996–1003, <http://dx.doi.org/10.1590/1414-431X20154397>
ISSN 1414-431X

Intensity of swimming exercise influences aortic reactivity in rats

A.F. Brito^{1,2,3}, A.S. Silva³, I.L.L. Souza^{1,2}, J.C. Pereira^{1,2} and B.A. da Silva^{1,2}

¹Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, Paraíba, Brasil

²Laboratório de Farmacologia Funcional Professor George Thomas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, Paraíba, Brasil

³Laboratório de Estudos do Treinamento Físico Aplicado ao Desempenho e Saúde, Departamento de Educação Física, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, Paraíba, Brasil

Abstract

Exercise is known to cause a vasodilatory response; however, the correlation between the vasorelaxant response and different training intensities has not been investigated. Therefore, this study evaluated the vascular reactivity and lipid peroxidation after different intensities of swimming exercise in rats. Male Wistar rats (aged 8 weeks; 250–300 g) underwent forced swimming for 1 h whilst tied to loads of 3, 4, 5, 6, and 8% of their body weight, respectively (groups G3, G4, G5, G6 and G8, respectively; n=5 each). Immediately after the test, the aorta was removed and suspended in an organ bath. Cumulative relaxation in response to acetylcholine (10^{-12} – 10^{-4} M) and contraction in response to phenylephrine (10^{-12} – 10^{-5} M) were measured. Oxidative stress was estimated by determining malondialdehyde concentration. The percentages of aorta relaxation were significantly higher in G3 (7.9 ± 0.20), G4 (7.8 ± 0.29), and G5 (7.9 ± 0.21), compared to the control group (7.2 ± 0.04), while relaxation in the G6 (7.4 ± 0.25) and G8 (7.0 ± 0.06) groups was similar to the control group. In contrast, the percentage of contraction was significantly higher in G6 (8.8 ± 0.1) and G8 (9.7 ± 0.29) compared to the control (7.1 ± 0.1), G3 (7.3 ± 0.2), G4 (7.2 ± 0.1) and G5 (7.2 ± 0.2) groups. Lipid peroxidation levels in the aorta were similar to control levels in G3, G4 and G5, but higher in G6 and G8, and significantly higher in G8 (one-way ANOVA). These results indicate a reduction in vasorelaxing activity and an increase in contractile activity in rat aortas after high-intensity exercise, followed by an increase in lipid peroxidation.

Key words: Aerobic exercise; Anaerobic exercise; Lipid peroxidation; Smooth muscle; Swimming; Vessel

Introduction

Improvements in vasomotor function are one of the many benefits associated with aerobic exercise. This involves an increase in endothelium-dependent vasodilation and an attenuation of the vasoconstrictor response, as observed in healthy animals (1–3), models of hypertension (4) and in humans (5,6).

Bechara et al. (7) showed that improvements in the vasodilator response occurred immediately after a single exercise session performed on a treadmill at 60% of maximal exercise capacity, directly related to an increase in the bioavailability of endothelial nitric oxide and attenuation of the maximal contractile response (8,9). This post-exercise response model is relevant to the development of post-exercise hypotension in humans, in which both hypertensive and normotensive subjects experience a reduction in blood pressure during the first minute after a single exercise session (10–12), which may continue for hours after the exercise session (13). This post-exercise

hypotension may be partly explained by a transient increase in vasodilator activity (14).

Post-exercise hypotension is more evident following moderate-intensity exercise (60–70% of $\dot{V}O_2$ max) (15), though even mild exercise has been reported to promote post-exercise hypotension (16,17). In contrast, high-intensity exercise has been reported to eliminate the hypotensive effect or even promote increased blood pressure (16,18). The mechanisms responsible for these changes in blood pressure in response to high-intensity exercise have been investigated and include roles for sympathetic activity (10), increased angiotensin-converting enzyme (19), and oxidative stress (20). However, no studies have yet determined if vascular reactivity is involved in the differential blood pressure response to exercise intensity.

We hypothesized that high-intensity exercise might result in a smaller relaxant response and greater contractile

Correspondence: A.F. Brito: <alineebrito@gmail.com>.

Received September 25, 2014. Accepted January 16, 2015. First published online September 18, 2015.

Anexos

Anexo 1 – Certidão de aprovação do projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPB).

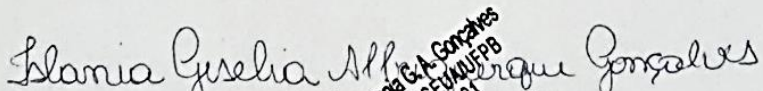



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)**

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “**Estudo toxicológico e farmacológico sobre músculo liso intestinal da esponja *Oceanapia* sp. (Oceanapiidae)**”, protocolo nº **146/2015** sob a responsabilidade da pesquisadora **Dra. Fabiana de Andrade Cavalcante** – que envolve a produção, manutenção e/ou a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado *ad referendum* pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA-UFPB).

Vigência do Projeto	2015 a 2017
Espécie/linhagem	Camundongos Swiss (<i>Mus musculus</i>) Cobaia selvagem (<i>Cavia porcellus</i>)
Número de animais	195 camundongos 63 cobaias
Peso/idade	Camundongos 02 meses (25 a 35 g) Cobaias 02 meses (300 a 500 g)
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	Biotério Prof. Thomas George



Prof. Dra. Islania Giselia Albuquerque Gonçalves
Coordenadora do CEUA-UFPB

CEUA-UFPB – Campus I – Reitoria - 1º andar - E-mail: ceua@ufpb.br – Site: www.ufpb.br/ceua/

Anexo 2 – Triagem comportamental do OC-EtOH na dose de 2000 mg/kg (v.o.) (Adaptado de Almeida et al., 1999).

SNC ESTIMULANTE	30 min.	1 h	2 h	3 h	4 h
Hiperatividade					
Agressividade					
Tremores					
Convulsão					
Piloereção					
SNC DEPRESSOR	30 min.	1 h	2 h	3 h	4 h
Sedação					
Ataxia					
Catatonía					
Analgesia					
Perda do reflexo corneal					
Perda do reflexo auricular					
Dispneia					
OUTROS COMPORTAMENTOS	30 min.	1 h	2 h	3 h	4 h
Ambulação					
Escalar					
Contorções abdominais					
Hemorragia					
Automutilação					
Vômito					

(0) Sem efeito (-) Efeito diminuído (+) Efeito aumentado

Anexo 3 – Fluxograma de realização do teste de toxicidade aguda com uma dose inicial de 2000 mg/kg.

