

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Fisiologia e Biofísica
Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia e Farmacologia

**EFEITO DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS DE *Echinodorus
macrophyllus* E DE FRAÇÕES SEMIPURIFICADAS SOBRE A
FUNÇÃO RENAL EM RATOS COM NECROSE TUBULAR
AGUDA INDUZIDA POR GENTAMICINA**

GUSTAVO PEREIRA COSENZA

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Aparecida Ribeiro Vieira

Co-Orientadora: Prof^a Dr^a Maria das Graças Lins Brandão

Belo Horizonte
2010

GUSTAVO PEREIRA COSENZA

EFEITO DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS DE *Echinodorus macrophyllus* E DE FRAÇÕES SEMI PURIFICADAS SOBRE A FUNÇÃO RENAL EM RATOS COM NECROSE TUBULAR AGUDA INDUZIDA POR GENTAMICINA

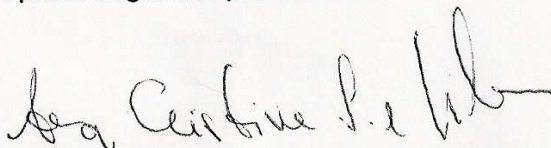
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas, na área de concentração de Farmacologia, sob orientação da Prof^a Maria Aparecida Ribeiro Vieira e co-orientação da Prof^a Maria das Graças Lins Brandão.

Belo Horizonte
2010

“EFEITO DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS DE ENCHINODORUS MACROPHYLLUS E DE FRAÇÕES SEMIPURIFICADAS SOBRE A FUNÇÃO RENAL EM RATOS COM NECROSE TUBULAR AGUDA INDUZIDA POR GENTAMICINA”.

GUSTAVO PEREIRA COSENZA

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia 12 de agosto de 2010, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



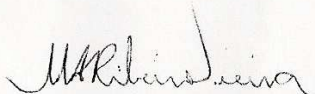
PROFA. DRA. ANA CRISTINA SIMÕES E SILVA
DEPTO DE PEDIATRIA
FACULDADE DE MEDICINA/UFMG



PROF. DR. STEYNER DE FRANÇA CORTES
DEPTO DE FARMACOLOGIA
ICB/UFMG



PROFA. DRA. MARIA DAS GRAÇAS LINS BRANDÃO
FACULDADE DE FARMÁCIA/UFMG, CO-ORIENTADORA



PROFA. DRA. MARIA APARECIDA RIBEIRO VIEIRA
DEPTO DE FISILOGIA E BIOFÍSICA
ICB-UFMG, ORIENTADORA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-Fisiologia e Farmacologia
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 12 de agosto de 2010.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiologia Renal “Professor Fernando Alzamora”, do Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, sob a orientação da Prof^a Dr^a Maria Aparecida Ribeiro Vieira e co-orientação da Prof^a Dr^a Maria das Graças Lins Brandão, na vigência de auxílio concedido pelo CAPES.

Dedico este trabalho à minha querida família e à minha namorada Celeste, pelo incentivo e por sempre acreditarem em meus ideais.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Dr^a Maria Aparecida Ribeiro Vieira, pela oportunidade oferecida e por iniciar-me na vida científica. Ela ensinou-me a enxergar que a ciência não é uma simples execução de tarefas e, sim, uma busca por perguntas que vão além da imaginação. Muito obrigado pela paciência para ensinar-me e por possuir disposição para ajudar em todas as etapas de meu trabalho. Muito obrigado mesmo; você é uma grande orientadora.

À Prof^a Dra Maria da Graças Lins Brandão pela amizade e pela orientação científica, sempre persistente ao longo destes 11 anos de minha caminhada acadêmica, científica e profissional.

Aos meus amigos do Laboratório de Fisiologia Renal pela ajuda, companheirismo e paciência em todas as etapas do meu trabalho. São eles: Lílian Pacheco, Lúcio Diniz, Viviane Portella e Ana Paula Araújo.

À Roseli Martins, técnica do Laboratório de Fisiologia Renal, pela ajuda, conselhos e por sempre entusiasmar-me em minhas idéias.

Às minhas estagiárias Laís (ICB/UFMG) e Darly (FAFAR/UFMG) pela ajuda durante a coleta e preparo do material vegetal e execução dos experimentos.

Aos meus grandes amigos Cristiano Cota (Bidu), Henrique Freitas, Valdir Latorre, João Augusto e João Paulo que sempre me apoiaram durante esta caminhada.

Aos meus colegas do Departamento de Fisiologia e Biofísica e do Departamento de Farmacologia/ICB/UFMG, principalmente, Gustavo Lopes (NNC), Mauro Cunha (Biologia Molecular), Roberto (Hipertensão) e Celso (Antitumorais), pela amizade e sugestões durante a realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Farmacognosia da FAFAR/UFMG, através da Prof^a Dr^a Maria das Graças Lins Brandão, pela ajuda no preparo do extrato e fracionamento do material vegetal.

Ao DATAPLAMT, também, através da Prof^a Dr^a Maria das Graças Lins Brandão por disponibilizar, sempre que necessário, a sua coleção de plantas vivas, que foi a nossa matéria-prima: as folhas de *Echinodorus macrophyllus* e pelo processamento deste material.

Ao Laboratório de Biofísica do Departamento de Fisiologia e Biofísica/ICB, através do Prof Dr Jorge Luiz Pesquero, por permitir a utilização da centrífuga de *ependorf*.

Ao Laboratório de Patologia de Protozooses do Departamento de Patologia/ICB, através do Prof Dr Marcelo Caliari, pela ajuda na execução e interpretação das análises morfológicas.

Aos técnicos Darcy Ferreira e Janine Costa pela atenção e dedicação quando solicitados.

À secretaria da Pós-Graduação, em nome de Maria Célia da Silva Costa, pela competência nos serviços prestados aos alunos durante o curso.

À Fundação Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por fornecer minha bolsa de estudo.

Por ultimo, à minha família Boanerges, Dirce, Braz, Maria e meus sobrinhos Eduardo e Bernardo. E também à minha querida namorada e futura esposa Celeste Cristina. Vocês são a inspiração do meu viver; sei que sem o apoio de vocês não teria concluído este trabalho.

LISTA DE ABREVEATURAS

- ACN: acetonitrila
- C H₂O: *Clearance* água livre
- CCD: Cromatografia em camada delgada
- CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência
- Cosm: *Clearance* osmolar
- EB: Extrato Bruto
- FAE: Fração acetato de etila
- FAq: Fração aquosa
- FB: Fração N-butanólica
- FSR: Fluxo sanguíneo renal
- HPLC: *High performance liquid chromatograph*
- NTA: Necrose tubular aguda
- OMS: Organização mundial de saúde
- PAF: Fator de agregação plaquetária
- RFG: Ritmo de filtração glomerular
- SHR: Ratos espontaneamente hipertensos
- SRA: Sistema renina angiotensina
- THF: Tetrahydrofurano

RESUMO

A *Echinodorus macrophyllus* (*E. macrophyllus*), família alismatacea, é uma espécie nativa do Brasil onde é conhecida por chapéu de couro, chá mineiro e erva de pântano. O objetivo deste trabalho foi avaliar o possível efeito do extrato bruto das folhas de *E. macrophyllus* (EB) e de frações dele extraídas (FAE, FB e FAq) sobre a função renal em ratos normais e em ratos com necrose tubular aguda (NTA) induzida por gentamicina (GT). O EB, obtido por percolação, foi submetido à extração com acetato de etila, originando uma fração rica em flavonóides (FAE). Em seguida, a fração aquosa restante foi extraída com N-butanol dando origem à fração butanólica (FB). A fração aquosa restante foi denominada de FAq. A diurese foi avaliada em ratos Wistar, machos, normais (250-350g). Os ratos foram volume-expandidos (4% do peso corporal) com NaCl 0,9% na ausência (controle) e presença de doses variáveis (10-1000 mg/kg) de EB, FAE, FB e FAQ. Em seguida, os ratos foram colocados, individualmente, em gaiolas metabólicas. O volume de urina foi medido a cada 30 min durante 3 h (180 min). Para avaliar o efeito do EB, FAE e FB sobre a função renal, foram usados 8 grupos de ratos sendo 4 grupos constituídos de ratos normais (Sal Sal, Sal EB, Sal FAE e Sal FB) e 4 de ratos com NTA (GT Sal, GT EB, GT FAE e GT FB). O experimento foi dividido em três períodos: aclimação (ACL), indução de NTA (Sal ou GT) e tratamento (EB, FAE ou FB). Após a ACL, a NTA foi ou não (receberam salina) induzida com GT, por 5 dias. Ao término desse período, tanto os ratos normais como aqueles com NTA foram tratados ou não (receberam salina), por gavagem, com EB, FAE ou FB, por 7 dias. Amostras de urina e plasma foram coletadas ao final da ACL, ao final da indução de NTA e ao 4º e 7º dias de tratamento. No perfil cromatográfico do EB, FAE e FB foi identificada a presença de diversos flavonóides (vitexina, isovitexina e orientina). Os resultados mostraram que o chá pode ter uma ação ambígua sobre a diurese (aumenta e diminui). Já o EB exerceu uma ação antidiurética principalmente na dose de 300 e 1000 mg/kg. Embora sem efeito proeminente nos ratos normais, nos ratos com NTA, o EB reverteu o aumento da creatinina plasmática e a redução do RFG e das frações de excreção de sódio e potássio. A FB, embora não tenha afetado a filtração glomerular, também reduziu a fração de excreção desses eletrólitos. Isto sugere que a queda nessa excreção, observada em resposta ao EB, pode ser devido à fração FB que é rica em saponinas, mas também possui flavonóides. Como a FAE é uma fração mais rica em flavonóides do que a FB e não interferiu com a excreção do sódio e do potássio, pode-se sugerir que tal efeito foi devido às saponinas presentes na FB. Em resumo, os nossos resultados mostram que, sob as condições por nós utilizadas, embora a *E. macrophyllus* não tenha induzido o efeito esperado sobre a diurese, ela mostrou-se eficaz na melhoria da função glomerular que foi prejudicada pelo GT. O EB também parece ter um efeito tubular benéfico pois foi capaz de reduzir a excreção de sódio e potássio que se encontrava elevada em resposta à GT. Este efeito tubular pode ter sido causado por substâncias (como as saponinas) encontradas na FB.

Palavras-Chave: Fisiologia renal, *E. macrophyllus*, gentamicina, insuficiência renal aguda, flavonóides.

ABSTRACT

The *Echinodorus macrophyllus* (*E. macrophyllus*), Alismatacea family, is a native specie to Brazil where he is known for leather hat, tea mineiro and herb swamp. The aim of this study was to evaluate the possible effect of the crude extract of the leaves of *E. macrophyllus* (EB) and it extracted fractions (FAE, FB e FAq) on renal function in normal rat and rat with acute tubular necrosis (ATN) induced by gentamicin (GT). EB, obtained by percolation, was submitted to extraction with ethyl acetate, yielding a fraction rich in flavonoids (FAE). Then, the remaining aqueous fraction was extracted with n-butanol resulting in the butanol fraction (FB). The remaining aqueous fraction was named FAq. Diuresis was assessed in male Wistar rats, normal (250-350g). The rats were volume-expanded (4% of body weight) with 0.9% NaCl in the absence (control) and presence of varying doses (10-1000 mg / kg) of EB, FAE, FB e FAq. Then the rats were placed individually in metabolic cages. The urine volume was measured every 30 min for 3 h (180 min). To evaluate the effect of EB, FB and FAq on renal function, were used 8 groups of rats were 4 groups consisting of normal rats (Sal Sal, Sal EB, Sal FAE e Sal FB) and 4 rats with ATN (GT Sal, GT EB, GT FAE e GT FB). The experiment was divided into three periods: acclimatation (ACL), induction of NTA (Sal or GT) and treatment (EB, FB or FAE). After the ACL, the NTA was or not (with saline) induced with GT, for five days. After this period, both normal rat and those rat with ATN were treated or not (with saline) by gavage, with EB, FB or FAE for 7 days. Urine and plasma were collected at the end of the ACL at the end of the induction of NTA and 4 and 7 days of treatment. In the chromatographic profile of EB, FB and FAE showed the presence of several flavonoids (vitexin, isovitexin and orientin). The results showed that tea may have an ambiguous action on diuresis (it increases and decreases). EB already exerted an antidiuretic action especially at a dose of 300 and 1000 mg/kg. Although no prominent effect in normal rats, rats with ATN, EB reversed the increase in plasma creatinine and the reduction of GFR and fractional excretion of sodium and potassium. The FB, although it has not affected the glomerular filtration rate also decreased the fractional excretion of electrolytes. This suggests that the decrease in this excretion observed in response to EB may be due to the FB fraction that is rich in saponins, but also has flavonoids. As the FAE the fraction richer in flavonoids than FB and did not interfere with the excretion of sodium and potassium, it can be suggested that this effect was due to the saponins present in the FB. In summary, our results show that under the conditions used by us, although *E. macrophyllus* did not induce the expected effect on diuresis, it was effective in improving glomerular function that was affected by GT. The EB also seems to have a beneficial effect tubular as it was able to reduce the excretion of sodium and potassium was elevated in response to GT. This tubular effect may be caused by substances (such as saponins) found in the FB.

Keywords: Renal Physiology, *E. macrophyllus*, gentamicin, acute renal failure, flavonoids.

SUMÁRIO

	Páginas
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Plantas medicinais	1
1.2 Plantas medicinais e função renal.....	3
1.3 <i>E. macrophyllus</i> e <i>E. grandiflorus</i>	5
1.4 Rins e doença renal crônica.....	9
1.5 Nefrotoxicidade induzida por gentamicina.....	11
1.6 Necrose tubular aguda.....	12
1.7 Agentes nefroprotetores	13
2 OBJETIVOS	15
2.1 Objetivos gerais.....	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
3 MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1 Animais.....	16
3.2 Procedimentos para com a planta <i>Echinodorus macrophyllus</i>	16
3.2.1 Identificação microscópica da espécie <i>E. macrophyllus</i>	16
3.2.2 Determinação da umidade das folhas secas de <i>E. macrophyllus</i>	17
3.2.3 Preparo da infusão (chá).....	17
3.2.4 Preparo e fracionamento do extrato bruto.....	17
3.2.5 Identificação de compostos no extrato bruto e nas frações semipurificadas.....	19
3.3 Protocolos experimentais.....	20
3.3.1 Protocolo I.....	20
3.3.2 Protocolo II.....	21
3.4 Grupos experimentais.....	23
3.5 Procedimentos analíticos para avaliação da Função Renal.....	24
3.5.1 Dosagem de creatinina.....	24
3.5.2 Dosagem da proteinúria.	26

3.5.3 Dosagem de Uréia.....	27
3.5.4 Dosagem de sódio e potássio.....	28
3.5.5 Determinação das osmolaridades plasmática e urinária.....	28
3.5.6 Peso dos rins.....	29
3.6 Análise morfológica renal.....	29
3.7 Análise estatística.....	29
4 RESULTADOS.....	30
4.1 Controle de qualidade das folhas de <i>E. macrophyllus</i> , obtenção e identificação do extrato bruto e frações.....	30
4.1.1 Análise microscópica e umidade das folhas de <i>E. macrophyllus</i>	30
4.1.2 Rendimentos obtidos do extrato bruto e das frações	31
4.1.3 Identificação de compostos no extrato bruto e nas frações semipurificadas por CCD.....	32
4.1.4 Identificação de compostos no extrato bruto e nas frações semipurificadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência...	32
4.2 Efeito das folhas de <i>E. macrophyllus</i> sobre a diurese em ratos normais	38
4.2.1 Efeito da infusão (chá) das folhas de <i>E. macrophyllus</i> sobre a diurese em ratos normais.....	
4.2.2 Efeito do extrato bruto das folhas de <i>E. macrophyllus</i> sobre a diurese em ratos normais	39
4.2.3 Efeito de frações semipurificadas do extrato bruto das folhas de <i>E. macrophyllus</i> sobre a diurese em ratos normais.....	40
4.3 Efeito do EB das folhas de <i>E. macrophyllus</i> e das FAE e FB sobre o peso corporal, peso dos rins e ingestão de água.....	42
4.3.1 Peso corporal e peso dos rins.....	42
4.3.2 Ingestão de água.....	45
4.4 Efeito do EB das folhas de <i>E. macrophyllus</i> e das FAE e FB sobre a função renal em ratos com NTA.....	45
4.4.1 Creatinina plasmática e ritmo de filtração glomerular.....	45
4.4.2 Uréia plasmática.....	49
4.4.3 Fluxo urinário e fração de excreção de água.....	49
4.4.4 Proteinúria.....	53
4.5 Efeito do EB das folhas de <i>E. macrophyllus</i> e das FAE e FB sobre a morfologia renal em ratos com NTA.....	60
5 DISCUSSÃO.....	63
5.1 Controle de qualidade das folhas de <i>E. macrophyllus</i> , obtenção do EB	

e frações.....	63
5.2 Identificação de compostos no EB e nas frações semipurificadas.....	64
5.3 Efeito do chá das folhas de <i>E. macrophyllus</i> , EB e frações semipurificadas sobre a diurese em ratos normais.....	66
5.4 Efeito do EB das folhas de <i>E. macrophyllus</i> e das frações FAE e FB sobre o peso corporal, peso dos rins e ingestão de água em ratos com NTA.....	67
5.5 Efeito do EB das folhas de <i>E. macrophyllus</i> e das frações FAE e FB sobre a função renal em ratos com NTA.....	68
6 CONCLUSÕES.....	72
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74

1 INTRODUÇÃO

1.1 Plantas medicinais

A história das plantas medicinais e fitoterapia se confunde com a história da farmácia, pois até o século XIX, grande parte dos medicamentos eram formulados com plantas medicinais. O descobrimento das propriedades curativas das plantas foi, no início, meramente intuitivo ou na observação dos animais que, quando doentes, buscavam nas ervas a cura para suas afecções.

Há milhares de anos, o homem vem utilizando plantas medicinais para o tratamento de diversas patologias. Por exemplo, há relatos do uso de plantas medicinais já por volta de 3000 A.C, na obra *Pen Ts 'ao* do chinês Shen Nung, onde foram listadas 366 plantas medicinais com atividade terapêutica (Ko, 1999; Tyler, 1996). O papiro de Ebers, manuscrito anterior a 1500 A.C, relatava que o faraó Ramsés I e seus contemporâneos já conheciam e faziam uso de plantas medicinais. No papiro estão detalhadamente descritas centenas de plantas medicinais, e a forma de utilização no combate de diversas enfermidades. Algumas espécies vegetais descritas no papiro são utilizadas até os dias de hoje, como sene, papoula e meimendo.

No ano de 280 A.C inicia-se o período de Hipócrates, considerado o “pai da medicina”, com sua publicação *Corpus Hippocraticum*, consagrando a utilização de plantas medicinais como terapia.

Já no ano de 78 D.C, Dioscorides descreveu cerca de seiscentas plantas medicinais no tratado *De Matéria Medica*. Este tratado foi considerado como primeiro livro mais influente sobre plantas medicinais da história e foi fonte de referência por mais de quatorze séculos (Robbers *et al.*, 1996; Tyler, 1996). Em torno de 160 a 180 D.C surge o médico grego Galeno que inicia a “farmácia galena”, utilizando diversas plantas medicinais como matéria-prima em suas preparações magistrais. Foi a partir da revolução industrial e do desenvolvimento da química orgânica, que o uso de substâncias naturais passou a ser menos utilizado. O isolamento da morfina em 1803 marcou o início do processo de extração de princípios ativos vegetais. A partir de então, outras substâncias foram

isoladas como, por exemplo, a quinina e quinidina obtidas da *Cinchona* em 1819, a atropina da *Atropa belladonna* em 1831, que passaram a ser utilizados em substituição aos extratos vegetais (Schulz *et al.*, 2001; Tyler, 1996). Além disso, a produção de fármacos via síntese química, o crescimento do poder econômico das indústrias farmacêuticas e a ausência da comprovação científica de eficácia das substâncias de origem vegetal aliada às dificuldades de controle de qualidade, estudos farmacológicos e toxicológicos dos extratos vegetais até então utilizados, impulsionaram a substituição destes por fármacos sintéticos (Rates, 2001).

Após a década de 1960, observou-se um desinteresse da indústria farmacêutica pela busca de novas substâncias de origem vegetal, por acreditar que já havia sido isoladas as principais substâncias ativas das drogas vegetais conhecidas (Schenkel *et al.*, 2000).

Só após a década de 1980, os avanços tecnológicos e o desenvolvimento de novos métodos de isolamento e purificação permitiram maior rapidez na identificação de substâncias em amostras complexas, como os extratos vegetais, ressurgindo assim um maior interesse pela pesquisa destas substâncias.

A resolução 3133 da Organização Mundial de Saúde alerta para a importância das plantas medicinais nos sistemas de saúde dos países em desenvolvimento (Akerle, 1985). O programa de medicina tradicional da OMS ressalta a importância dos estudos das plantas usadas na medicina popular com o objetivo de verificar tanto seu possível efeito terapêutico, como também a possível presença de substâncias tóxicas nestas plantas. Estes fatos enfatizam a necessidade de metodologia científica para caracterizar os efeitos fisiológicos, farmacológicos e toxicológicos das plantas medicinais. Soma-se a isto, a necessidade de isolamento e purificação dos eventuais compostos que apresentam atividade biológica.

Atualmente, as plantas medicinais são amplamente utilizadas, principalmente em programas de Fitoterapia para o tratamento de várias doenças, e também são utilizadas como fonte de matéria-prima para produção de fitoterápicos, fitofármacos e fitocosméticos.

1.2 Plantas medicinais e função renal

Diversas espécies medicinais são utilizadas na medicina tradicional como diurético ou utilizadas para tratar algum problema renal. No Brasil, o uso destas plantas data desde o descobrimento até os dias de hoje. Entre as diversas plantas podemos citar: *Persia gratissima* (abacateiro), *Chodrodendron platiphyllum* (abutua), *Gossypium herbaceum* (algodoeiro), *Chiococca brachiata* (cainca), *Echinodorus macrophyllus* (chapéu de couro), *Mikania hirsutissima* (cipó cabeludo), *Leonotis nepetifolia* (cordão de frade), *Cassia occidentalis* (fedegoso), *Smilax japecanga* (japecanga), *Ilex paraguariensis* (mate), *zea mays* (milho), *Heckeria umbellata* (pariparoba), *Smilax sp* (Salsaparrilha), *Ampelozizyphus amazonicus* (cerveja de índio) e *Imperata exaltata* (sapé). No entanto, existem poucos estudos, utilizando protocolos adequados, que comprovem os efeitos terapêuticos destas plantas, muito menos, a respeito dos seus mecanismos de ação. Das plantas citadas acima, apenas o milho e a cerveja de índio possuem dados relacionados à atividade diurética; este tipo de informação é importante, pois grande parte das plantas é nativa do Brasil e ainda não temos conhecimento sobre a maioria de seus constituintes químicos e suas ações farmacológicas.

As plantas medicinais podem promover a diurese de diversas formas, principalmente por aumentar a excreção de sódio e água. A maioria das pesquisas em relação à atividade diurética é com plantas que não são nativas do Brasil. Por exemplo, Haloui *et al.* (2000) avaliaram o efeito diurético do extrato aquoso de *Rosmarinus officinalis* e de *Centaurium erythraea* em ratos Wistar. Após o tratamento por sete dias, os extratos provocaram um aumento significativo na diurese e na excreção de sódio, potássio e cloreto, além de promoverem uma diminuição no ritmo de filtração glomerular.

Em um estudo comparativo da ação diurética da *Tribulus terrestris* e da *Zea mays*, Al-Ali *et al.* (2003) verificaram que o extrato aquoso de *tribulus terrestris* diluído em salina promoveu uma diurese inferior à furosemida e superior ao *Zea mays* nas doses administradas. A *Tribulus terrestris*, na dose administrada, aumentou a excreção de sódio, potássio e cloreto comparado ao grupo controle.

Em um outro estudo, Aissaoui *et al.* (2008) investigaram o efeito diurético da infusão contínua de extrato aquoso de *Coriandrum sativum* em ratos Wistar

anestesiados. O extrato infundido por 120 min, na dose de 100mg/kg, promoveu aumento do volume de urina, bem como aumento na excreção de sódio, potássio e no ritmo de filtração glomerular. Já Sripanidkulchai *et al.* (2001) avaliaram a atividade diurética de extratos das raízes de *Ananas comosus* e *Carica papaya*, em ratos Wistar. Estes extratos, administrados por gavagem na dose de 10mg/kg, exibiram efeitos equivalentes à hidroclorotiazida sobre a produção de urina e excreção de eletrólitos.

Extratos metanólicos das sementes de *Strychnos potatorum* administrados em doses crescentes em ratos Wistar promoveram aumento significativo no volume de urina, comparável ao efeito da furosemida. Houve também elevação na excreção de sódio, potássio e cloreto (Biswas *et al.*, 2001). Já Kreydiyyeh *et al.* (2002) mostraram que os extratos aquosos das sementes de *Petroselinum hortense* e de *Petroselinum sativum*, uma associação denominada parsley, aumentam, de forma significativa, o volume urinário; efeito este mediado pelo aumento na retenção renal de K^+ , provavelmente pela inibição da bomba Na^+/K^+ ATPase localizada no córtex e na medula renais.

A administração crônica do EB aquoso das folhas de *Stevia rebaudiana*, em ratos Wistar, induziu hipotensão, diurese e natriurese nos grupos tratados por 40 e 60 dias. Esses dados sugerem que esse EB induz vasodilatação sistêmica e renal, causando hipotensão, diurese e natriurese (Melis, 1995).

Em estudo de Diniz *et al.* (2009), foi avaliado o efeito diurético de uma planta nativa do Brasil, a *Ampelozizyphus amazonicus*. O EB, uma fração enriquecida em saponinas triperpênicas, e uma fração livre de saponinas foram avaliados. O EB e a fração livre de saponinas promoveram um aumento no volume urinário. Em contraste, a fração enriquecida em saponinas promoveu uma diminuição significativa do volume de urina. Os resultados indicam que o extrato bruto de *Ampelozizyphus amazonicus* possui compostos que podem provocar tanto diurese como antidiurese.

Outros estudos demonstram que algumas plantas exibem efeito antidiurético. Por exemplo, ratos tratados com EB aquoso de raízes de *Imperata cylindrica* sofreram queda no volume de urina quando comparado ao grupo controle (Sripanidkulchai *et al.*, 2001). De forma semelhante, ratos tratados com óleo essencial, extraído das sementes de *Pimpinella anisum*, demonstraram efeito

antidiurético. Esse efeito antidiurético pode estar associado a um aumento na atividade da Na^+/K^+ ATPase renal (Kreydiyyeh *et al.*, 2002).

1.3 *E. macrophyllus* (Kunth) Micheli e *E. grandiflorus* (Cham. E Schltl.) Micheli

As espécies do gênero *Echinodorus* são monocotiledôneas pertencentes à família Alismataceae e são restritas às regiões tropicais. As espécies, cerca de 26, podem ser encontradas desde os Estados Unidos até a Patagônia (Haynes & Nielsen, 1994). No Brasil, as espécies predominantes são a *Echinodorus macrophyllus* (*E. macrophyllus*) e *Echinodorus grandiflorus* (*E. grandiflorus*), as quais se distribuem em locais alagados e de solo úmido (Fig. 1). As espécies são conhecidas, popularmente, como chapéu de couro, chá mineiro, erva de pântano e erva de brejo (Lorenzi & Matos, 2002; Nunes *et al.*, 2003). A espécie *E. macrophyllus* é uma planta medicinal muito importante para a medicina tradicional, encontrando-se descrita na Farmacopéia Brasileira, 1ª Edição (1926) e na Farmacopéia Brasileira, 2ª Edição (1959). Mais recente é a monografia da espécie *E. grandiflorus* que está presente na consulta pública nº 38, de 22 junho de 2009, sendo uma futura monografia a constar na Farmacopéia Brasileira, 5ª Edição.

O chá das folhas de *E. macrophyllus* e *E. grandiflorus* é utilizado, na medicina popular brasileira, como diurético, depurativo do sangue, antiinflamatório, anti-hipertensivo, e útil para tratamento de doenças hepáticas, afecções cutâneas, doenças venéreas, artrite, reumatismo, entre outras (Brandão *et al.*, 2009; Correia, 1984). Das folhas de *E. macrophyllus* já foram isoladas e identificadas várias classes de substâncias químicas como alcalóides, glicosídeos, óleos essenciais, flavonóides, ácidos orgânicos e diterpenos. Cabe ressaltar que o diterpeno ácido echinóico (Fig. 2C), é o composto secundário predominante obtido na extração metanólica das folhas secas da planta (Manns & Hartmann, 1993; Pimenta, 2000; Kobayashi *et al.*, 2000). Já em outro estudo realizado por Pimenta (2002), foi mostrado que enquanto o ácido echinóico era predominante na fração hexânica, a isoorientina (Fig. 2B), isovitexina e ácido ferrúlico (Fig. 2A) são predominantes no extrato etanólico da espécie *E. grandiflorus*.



Figura 1. Espécie *Echinodorus macrophyllus* em seu habitat natural. Foto superior, locais alagados; Foto inferior, solo úmido. Fotografias obtidas no Museu de História Natural e Jardim Botânico da UFMG, Belo Horizonte, MG, Fevereiro de 2009.

No entanto, mesmo tendo conhecimento sobre a composição do extrato das folhas e até mesmo a cerca dos componentes predominantes, existem muito

poucos dados científicos a respeito dos efeitos biológicos do chá e/ou do EB, obtidos com as folhas.

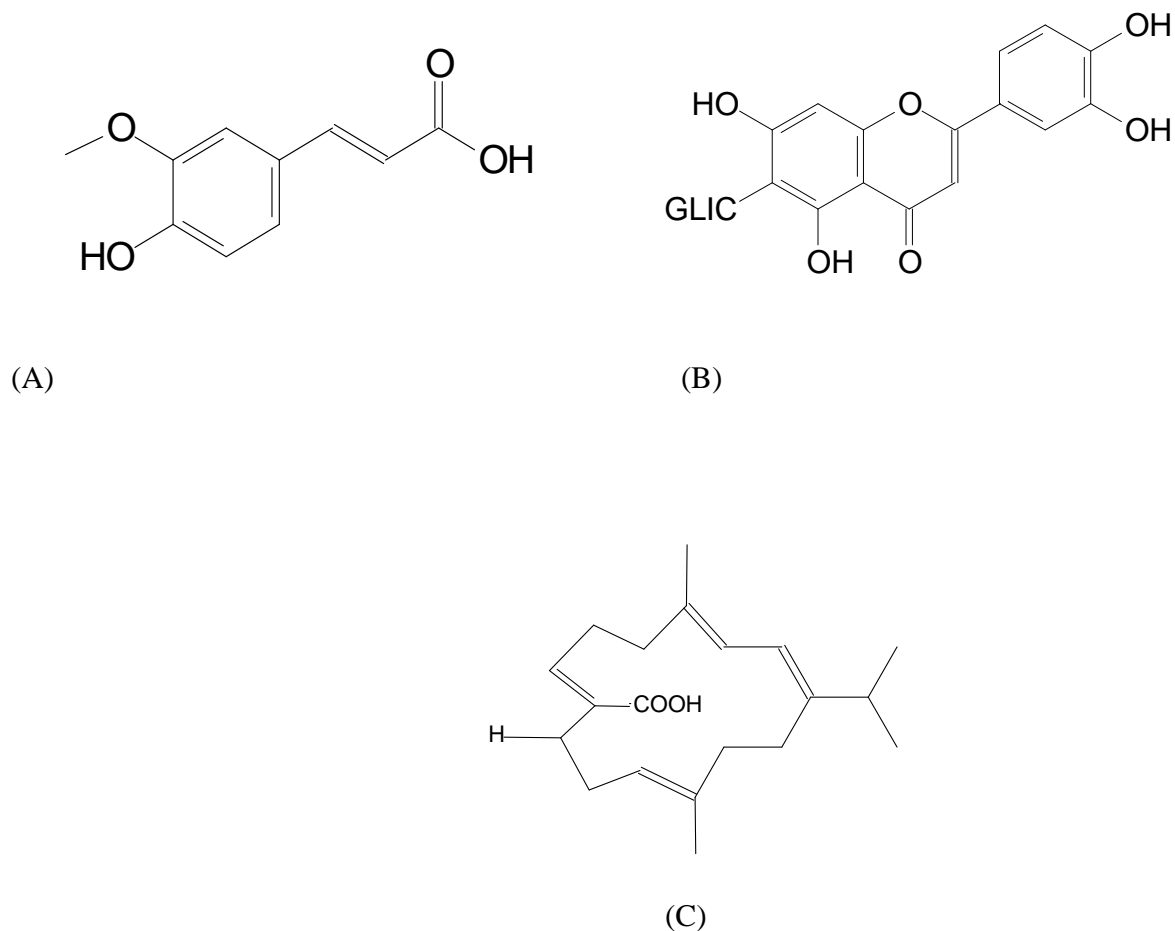


Figura 2. Estruturas químicas dos principais metabólitos secundários encontrados nas folhas de *Echinodorus grandiflorus*: (A) Ácido ferrúlico, (B) Isoorientina e (C) ácido echinóico.

Menos ainda se sabe sobre qual (is) componente(s) é (são) o(s) responsável (eis) pelos possíveis efeitos atribuídos à planta.

Quanto a possíveis efeitos toxicológicos, o extrato aquoso das folhas de *E. macrophyllus* foi avaliado por Lopes *et al.* (2000). Em ensaios *in vitro* de mutagenicidade em culturas de células de hepatomas e células epiteliais renais, o extrato aquoso não apresentou efeito citotóxico. Em outro experimento utilizando camundongos Swiss, após 6 semanas de ingestão contínua do extrato liofilizado (3, 23 e 297 mg/kg) ou extrato bruto (2200 mg/kg), os animais não apresentaram efeitos genotóxicos no fígado, rins e células sanguíneas. Entretanto, análises de DNA de células renais detectaram vários efeitos genotóxicos dos extratos em altas

doses. A dose recomendada para uso humano foi 23mg/kg, por não apresentar tais efeitos genotóxicos.

Já em modelos experimentais de nocicepção, como o teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético, tempo de lambida da pata induzida por formalina e edema de pata induzida por carragenina, o extrato metanólico dos rizomas de *E. grandiflorus* apresentou uma potente atividade antinociceptiva e antiinflamatória (Dutra *et al.*, 2006).

Ao investigar um possível efeito imunomodulador do extrato aquoso da espécie *E. macrophyllus* sobre a resposta imunológica de linfócitos T e B, Sabino *et al.* (2007) observaram que tal extrato produzia uma inibição de anticorpos para linfócitos B, reduzindo a infiltração de leucócitos no tecido subcutâneo. Além disso, quando testados *in vitro* em linhagens de células J774, o extrato provocou inibição da produção de óxido nítrico dose dependente, não apresentando nenhum efeito citotóxico. Com esses resultados, os autores sugeriram que a espécie *E. macrophyllus* possui componentes químicos que podem atuar como agente imunossupressivo em doenças reumáticas do tipo autoimune.

A atividade antimicrobiana do extrato hidroalcólico de *E. macrophyllus* foi avaliada pelo método de difusão em Agar, onde foi verificando resultado positivo contra *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium* e *Staphylococcus aureus*. As concentrações inibitórias mínimas foram de 100, 10 e 1 mg/ml, respectivamente. Em outras linhagens de bactérias (*Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*), o extrato apresentou inibição parcial do crescimento microbiano (Júnior *et al.*, 2004).

A atividade hipotensora de extrato hexânico (EH), metanólico (EM) e aquoso (EA) obtido das folhas de *E. grandiflorus* foi avaliado em ratos Wistar anestesiados com pentobarbital sob ventilação mecânica controlada. Dos 3 extratos testados, foram observados maiores atividades para os EA e EH. A administração intravenosa de doses crescentes de EA e de EH (3, 10, 30 e 100mg/kg) induziu um efeito hipotensor reversível e dose dependente. A queda máxima da pressão arterial foi de $37 \pm 5\%$ para o EA e de $38 \pm 1\%$ para o EH (Pimenta *et al.*, 1998).

Em estudo posterior de Barros *et Al.* (1999), avaliando a atividade dos mesmos extratos (EA e EH) e utilizando metodologia similar para avaliação da pressão arterial, encontraram os mesmos efeitos anti-hipertensivos reversíveis e dose dependentes (12,5 a 100 mg/kg), em ratos com hipertensão induzida por L-

NAME (20mg/kg i.v.). Nesta condição, os animais apresentaram redução significativa da pressão arterial de $59 \pm 11\%$ com o EH e de $95 \pm 5\%$ com o EA. Similarmente, em ratos SHR, o extrato etanólico (3 a 100 mg/kg i.v.) reduziu a pressão arterial em $51 \pm 6\%$. Em estudos mais recentes, a ação vasodilatadora do extrato bruto de *E. grandiflorus*, em ratos SHR, também foi confirmada (Lessa *et al.*, 2008). O extrato aquoso das folhas de *E. grandiflorus* também exibe efeito vasodilatador, *in vitro*, em anéis isolados de aorta de coelho e em rim isolado de coelho (Tibiriçá *et al.*, 2007). Essa resposta dependia da integridade do endotélio vascular. Os autores sugeriram que a vasodilatação se dava por três mecanismos diferentes, pela via de produção de óxido nítrico, por estimulação colinérgica muscarínica e por atuação, do extrato, em receptores de fator de agregação plaquetária (PAF).

Entre os poucos dados disponíveis na literatura em relação ao efeito diurético da espécie, podemos citar o trabalho de Ribeiro *et al.* (1988) onde foi verificado que a administração do extrato bruto das folhas de *E. grandiflorus* induzia diurese em ratas. Um trabalho mais recente (Cardoso *et al.*, 2003) confirma essas observações obtidas com o extrato bruto, pois foi verificado que o chá das folhas de *E. grandiflorus* administrado por gavagem também aumenta a produção de urina em camundongos.

1.4 Doença renal crônica

O rim é um órgão complexo que exerce inúmeras funções, tais como eliminação de produtos oriundos do metabolismo, regulação do balanço hidroeletrólítico, do equilíbrio ácido-básico e da pressão sanguínea. Quando os rins diminuem sua atividade ou mesmo param de funcionar, é desencadeado um quadro denominado insuficiência renal. A insuficiência renal pode ser diagnosticada como injúria renal aguda (IRA) ou como doença renal crônica (DRC).

A injúria renal aguda caracteriza-se por uma redução abrupta da função renal, que se mantém por períodos variáveis, resultando na incapacidade dos rins em exercer suas funções básicas de excreção e manutenção da homeostase hidroeletrólítica do organismo (Brenner *et al.*, 2000). Dentre as etiologias de injúria renal aguda, em torno de 62% são decorrentes de necrose tubular aguda (NTA),

consequente às causas isquêmicas e tóxicas (Boin *et al.*, 1998; Seguro *et al.*, 2000).

A injúria renal aguda pode ser reversível independentemente da etiologia e leva ao acúmulo de substâncias nitrogenadas (uréia e creatinina), acompanhado ou não de diminuição da diurese (Conger, 1998). A redução abrupta do ritmo de filtração glomerular (RFG) e do fluxo sanguíneo renal (FSR) decorrente, entre outros, da intensa vasoconstrição intra-renal, é o ponto crucial da injúria renal aguda (Nissensson, 1998). Segundo este autor, os fatores mais importantes no início e na manutenção da injúria renal aguda são a queda da permeabilidade do capilar glomerular, *back-leak* do filtrado glomerular, obstrução tubular e vasoconstrição intrarenal. Mas, os mecanismos pelos quais muitas alterações observadas na injúria renal aguda ocorrem, ainda não foram esclarecidos.

A doença renal crônica pode ser desencadeada por diversos mecanismos, que causam uma redução lenta da função renal, levando ao acúmulo de diversos produtos de degradação. A lesão pode causar danos irreversíveis aos rins e pode ser desencadeada principalmente por hipertensão arterial, glomerulopatias, diabetes mellitus e distúrbios autoimune, entre outras doenças. As alterações observadas na função renal são semelhantes às da injúria renal aguda, só que os sintomas manifestam-se lentamente.

Diante da dificuldade de investigar, em humanos, os mecanismos pelos quais a doença renal se instala e evolui, diversos pesquisadores têm desenvolvido e empregado modelos experimentais, utilizando animais, com o objetivo de reproduzir um quadro de insuficiência renal (Chen *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2000). Os principais modelos utilizam fármacos ou outras substâncias que, em altas doses, possuem efeito nefrotóxico, sendo as principais a cisplatina, glicerol, gentamicina e adenina.

A cisplatina é um potente antitumoral que usualmente é utilizado para tratamento de tumores sólidos. Em doses altas possui efeito nefrotóxico, provocando sérios danos nos túbulos proximais (Choei *et al.*, 1981). O mecanismo de ação não é totalmente elucidado, mais envolve aumento do *stress* oxidativo, com aumento da peroxidação lipídica (Hanneman & Baumann, 1991). A toxicidade renal provocada pela cisplatina pode ser em parte explicada pelo desequilíbrio da

homeostasia do Ca^{2+} intracelular e a perda de grupos tióis, o que pode levar ao aumento do *stress* oxidativo e subsequente morte celular (Montine & Borch, 1990).

O modelo de lesão renal induzida por adenina promove a formação de metabólitos anormais de compostos nitrogenados, que alteram o túbulo proximal, o túbulo distal e o glomérulo. Este modelo é bastante utilizado para indução de doença renal crônica em animais (Yokozawa *et al.*, 1986). Já o modelo de lesão de renal induzida por glicerol, é muito similar à NTA provocada em estados de rbdomiólise, onde ocorre trauma muscular e hemólise (Holt & Moore, 2000).

1.5 Nefrotoxicidade induzida pelo aminoglicosídeo gentamicina

O nome aminoglicosídeo se deve ao fato da molécula ser constituída por dois ou mais aminoaçúcares unidos por ligação glicosídica à hexose ou aminociclitol, que habitualmente está em posição central. Os aminoglicosídeos têm peso molecular que varia de 445 a 600 daltons e são altamente solúveis em água, estáveis em pH 6 a 8 e possuem estrutura polar catiônica, o que impede a sua absorção oral e dificulta sua penetração no espaço intracelular ou através da barreira hematoencefálica (Oliveira *et al.*, 2006).

A farmacocinética de todos os aminoglicosídeos é bastante semelhante. Devido à sua natureza polar, são pouco absorvidos pelo trato gastrointestinal, sendo que menos de 1% da dose é absorvida após a administração oral ou retal. A principal via de administração é a via parenteral, atingindo concentrações plasmáticas após 30-90 min após a sua aplicação. Sua eliminação ocorre pelos rins, através da filtração glomerular, sendo sua depuração cerca de 66%. A sua meia-vida é estimada de 30 - 700 h, o que faz com que haja eliminação 20 a 30 dias após a administração da última dose da droga (Oliveira *et al.*, 2006).

A gentamicina (Fig. 3) apresenta como uma das principais reações adversas, a nefrotoxicidade. Este efeito sobre os rins podem levar ao desenvolvimento de insuficiência renal (Kadkhodae *et al.*, 2005; Rogers *et al.*, 1987).

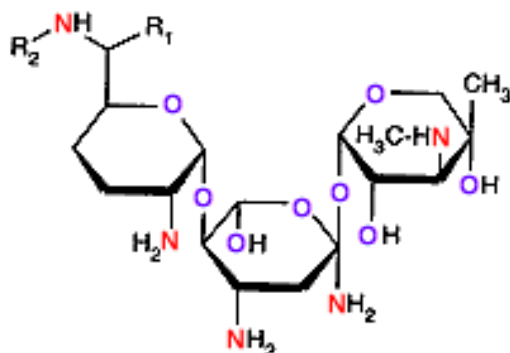


Figura 3. Estrutura química da gentamicina ($C_{21}H_{43}N_5O_7$).

As concentrações séricas observadas com as doses terapêuticas estão próximas da dose tóxica, conferindo um baixo índice terapêutico. A toxicidade celular é comum a praticamente todos aminoglicosídeos, em função de sua absorção para o meio intracelular (Oliveira *et al.*, 2006). As injúrias renais são induzidas pelo acúmulo da gentamicina nas células dos néfrons, inclusive nas células mesangiais, causando danos nos mecanismos fisiológicos de filtração glomerular e reabsorção tubular (Martínez-Salgado *et al.*, 2007)

O grupamento amina é que confere a toxicidade ao aminoglicosídeo, de modo que quanto maior o número de aminas maior a toxicidade do antibiótico. A gentamicina, quando comparada a outros aminoglicosídeos, apresenta maior nefrotoxicidade em relação, por exemplo, à netilmicina e à tobramicina (Cojocel *et al.*, 1984). A dose frequentemente utilizada é 80 mg/kg/dia por via subcutânea (Silan *et al.*, 2007; Ali *et al.*, 2009), e o efeito nefrotóxico da gentamicina é maior quando a droga é administrada de forma fracionada do que quando administrada em dose única (Oliveira *et al.*, 2001).

1.6 Necrose tubular aguda

A lesão renal induzida pela administração aguda de gentamicina é caracterizada pela NTA, localizada principalmente no túbulo proximal (Parsons *et al.*, 2000). Esta lesão é uma das alterações estruturais mais comuns associadas ao desenvolvimento da injúria renal aguda.

As causas para o desenvolvimento da lesão renal induzida pela gentamicina podem ser várias. Acredita-se que existam receptores específicos no

túbulo proximal onde ocorre a endocitose da gentamicina. A ligação na membrana tubular ocorre com a megalina, que é um receptor endocitótico que é expresso na membrana apical do epitélio do tubular proximal. Uma vez ligado, o complexo gentamicina-megalina é transportado para dentro da célula e se une ao lisossomo, onde irá fundir com estruturas preexistentes. Esta fusão causa deposição progressiva de lipídios polares, formando o corpo mielóide. Além disso, ocorrem várias outras alterações em organelas e enzimas, como nos ribossomos, nas mitocôndrias e na bomba Na^+/K^+ ATPase (Oliveira *et al.*, 2006).

Outro mecanismo proposto é que a gentamicina aumenta espécies reativas de oxigênio, que podem ser os agentes causadores da morte celular em diferentes estágios patológicos da lesão renal (Fantone & Ward, 1982; Halliwell & Gutteridge, 1990). A gentamicina também pode causar aumento cortical de fosfolipídios pela inibição de enzimas responsáveis pelo metabolismo de fosfolipídios (Laurent *et al.*, 1982), inibição ou perda da integridade da enzima Na^+/K^+ ATPase (Fukuda *et al.*, 1991), alterações das enzimas lisossomais e lesão das mitocôndrias, ativação do sistema renina angiotensina (Hishida *et al.*, 1994), assim como o aumento da síntese de tromboxano A₂ (Papanikolaou *et al.*, 1992) e de prostaglandina (Assael *et al.*, 1985).

As alterações provocadas pela gentamicina nos parâmetros da função renal são características da lesão renal, causando a NTA. Uma redução na concentração plasmática de K^+ (Silan *et al.*, 2007), bem como um aumento na fração de excreção de Na^+ e de K^+ (Volpini *et al.*, 2004), têm sido relatados em ratos tratados com gentamicina. O nível plasmático aumentado de creatinina, diminuição do RFG, aumento da uréia plasmática, aumento da proteinúria e a presença da enzima γ -glutamilttransferase (γ -GT) na urina são fortes indicadores de NTA (Stoycova *et al.*, 1983; Hofmeister *et al.*, 1986; Cuzzocrea *et al.*, 2002)

1.7 Agentes nefroprotetores

Na literatura, há diversos trabalhos que relatam efeito nefroprotetor ou renoprotetor de diferentes agentes em animais submetidos à indução de NTA pelo uso de gentamicina. Em grande parte desses trabalhos, o mecanismo de lesão renal é atribuído à formação de radicais livres. Também existem relato sobre diversas espécies vegetais ou de substâncias delas isoladas às quais são

atribuídas efeito antioxidante. Entre estas pode-se destacar a spirulina (Karadeniz, 2008), a L-carnitina (Kopple *et al.*, 2002), o extrato de *Ginkgo biloba* (Naidu, 2000), o resveratrol (Silan *et al.*, 2007), o extrato de *Withania somnifera* (Jeyanthi & Subramanian, 2009), o trapidil (Buyukafsar, 2001), a quercetina (Abdel-raheem, 2009), o curcumin (Farombi & Ekor, 2006), o extrato de *Phyllanthus amarus* (Adeneye & Benebo, 2008), a aminoguanidina (Polat *et al.*, 2006), a glibenclamida (Al-azzam, 2010), o licopeno (Karahana, 2005), o ebselen (Dhanarajan *et al.*, 2006), a N-acetylcysteina (Mazzon *et al.*, 2001), o ácido caféico fenilester (Vardi *et al.*, 2005), etc.

Além de alguns compostos isolados, diversas plantas medicinais estão sendo pesquisadas por possuírem uma possível ação renoprotetora. Singh *et al.* (2009) verificaram que o extrato aquoso de *Andrographis paniculata*, uma planta asiática tradicionalmente utilizada na medicina Ayurveda, apresentou efeito renoprotetor em ratos com NTA induzida por gentamicina. Já *Phyllanthus amarus*, uma planta tradicionalmente utilizada na África, foi estudada em modelos de injúria renal induzida por gentamicina e acetaminofeno. O tratamento com a *Phyllanthus amarus*, por 14 dias, indicaram que esta espécie possui efeito nefroprotetor por reduzir os níveis plasmáticos de uréia e creatinina e também por reduzir os danos histopatológicos. O possível mecanismo de ação seria devido à atividade antioxidante dos componentes presentes na espécie (Adeneye & Benebo, 2008).

A ação nefrotrotetora do extrato etanólico de *Aerva lantana* foi estudada em modelos de indução de nefrotoxicidade induzida por gentamicina e cisplatina. O extrato foi utilizado em regime curativo nas doses de 75,150 e 300 mg/kg. Os dados mostraram uma redução dose resposta nos níveis de uréia e creatinina plasmática e uma melhora nos danos histopatológicos (Shirwaikar *et al.*, 2004).

Em face dessas considerações, o nosso trabalho teve como objetivo investigar o uso popular da *E. macrophyllus* como diurético e, como as folhas da *E. macrophyllus* são ricas em compostos flavonóides e saponinas, também investigamos o possível efeito de duas frações (FAE e FB), ricas nestes compostos, semipurificadas a partir do EB sobre a NTA induzida por gentamicina em ratos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar o efeito do extrato bruto das folhas de *E. macrophyllus* e de suas frações semipurificadas FAE (acetato de etila) e FB (N-butanólica) sobre a função renal de ratos com injúria renal aguda (IRA) induzida por gentamicina.

2.2 Objetivos específicos

- Investigar, experimentalmente, o possível efeito diurético do chá e do extrato bruto das folhas de *E. macrophyllus* e das frações FAE, FB e FAq (fração aquosa) sobre a diurese em ratos normais;
- Identificar e caracterizar componentes do extrato bruto das folhas de *E. macrophyllus* e de suas frações semipurificadas por meio de cromatografia em camada delgada (CCD) e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).
- Investigar o efeito do extrato bruto das folhas de *E. macrophyllus* e de suas frações semipurificadas FAE e FB sobre as alterações na função renal induzidas pela gentamicina.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizados ratos Wistar, machos, procedentes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, com peso variando entre 250 e 300 g. Desde o nascimento, os animais foram mantidos sob um ciclo de claridade - escuridão sendo, 14 h de claridade e 10 h de escuridão, recebendo água e alimentação *ad libitum*. Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com o Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais (protocolo 177/08).

3.2 Procedimentos para com a planta *Echinodorus macrophyllus*

A espécie vegetal *E. macrophyllus* foi coletada em Fevereiro de 2009 no horto de plantas medicinais do Museu de História Natural e Jardim Botânico da Universidade Federal de Minas Gerais, com as seguintes coordenadas GPS: S 19° 53' 40.2" , H 043° 54' 48.3". A espécie coletada possui uma exsicata depositada no herbário do Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas (ICB/UFMG) sob o número BHCB 28557 (Leite *et al.*, 2007).

As folhas da *E. macrophyllus*, após coleta, foram secas em estufa a 40 °C e reduzidas a pó em moinho de facas. O controle de qualidade do pó das folhas foi baseado na monografia da *E. macrophyllus* que consta na Farmacopéia Brasileira, 1ª Edição, 1926.

3.2.1 Identificação microscópica da espécie *E. macrophyllus*

As análises foram realizadas para visualização de estruturas microscópicas características das folhas de *E. macrophyllus*. As estruturas são descritas na monografia da espécie vegetal presente na Farmacopéia Brasileira, 1ª Edição, 1926.

3.2.2 Determinação da umidade das folhas secas de *E. macrophyllus*

A umidade foi determinada pelo método gravimétrico, que é descrito na Farmacopéia Brasileira, 4ª Edição- Métodos Gerais de Farmacognosia V 4.2.3.

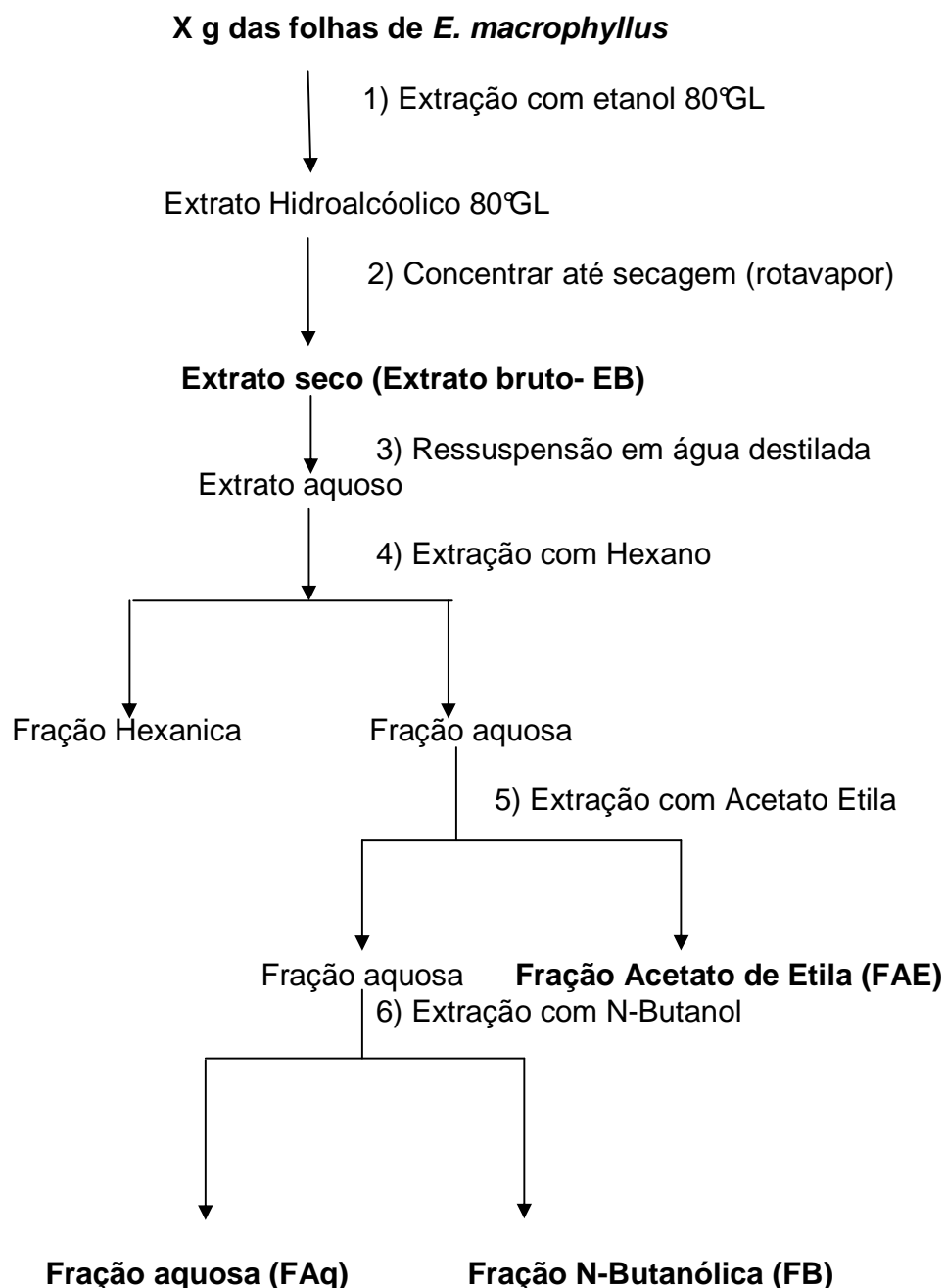
3.2.3 Preparo da infusão (chá)

A infusão (chá) foi obtida a partir do pó das folhas de *E. macrophyllus* (10 g) em solução de NaCl 0,9% (100 ml). O pó das folhas foi mantido abafado na solução de NaCl 0,9% por, aproximadamente, 10 min. Esta solução foi considerada a solução estoque a 10% (p/v). A partir de diluições sucessivas desta solução, novas soluções com concentrações de 5% (p/v) e de 2,5% (p/v) foram obtidas.

3.2.4 Preparo e fracionamento do extrato bruto

O processo utilizado para a produção do EB da *E. macrophyllus* foi a percolação a frio, que é o método padronizado e descrito na Farmacopéia Brasileira, 4ª Edição. Para a produção desse extrato, foi utilizado pó das folhas e álcool etílico 80 GL° como solvente extrator. Após o processo de percolação, o percolato foi concentrado a vácuo até secagem completa, obtendo-se o extrato seco. Em seguida, esse extrato foi submetido a fracionamento, que teve por objetivo separar componentes de acordo com suas características de polaridade. Para isso, uma quantidade determinada do EB foi resuspensa em água destilada. A suspensão obtida foi transferida para um funil de separação e, em seguida, solventes em ordem crescente de polaridade, foram adicionados. Primeiramente, o hexano foi adicionado para extrair componentes de baixa polaridade tais como, gorduras, clorofila, óleos essenciais e triterpenos. Logo a seguir, o acetato de etila foi adicionado para extrair componentes de polaridade intermediária, principalmente, os flavonóides (fração FAE). Por último, o N-butanol saturado com água foi adicionado para a extração de glicosídeos, saponinas e outros compostos de alta polaridade (fração FB). A fração restante continha os componentes solúveis em água (fração FAq). Uma vez terminado esse fracionamento, as frações obtidas foram concentradas a vácuo até secagem completa e foram armazenadas a 4 °C até o momento de sua utilização. Todas as frações, exceto a primeira (hexânica), foram submetidas a testes de identificação dos constituintes

químicos por cromatografia em camada delgada (CCD) e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (*High performance liquid chromatograph*, HPLC). O fluxograma summarizando o preparo e fracionamento do extrato bruto encontra-se abaixo.



O preparo e o fracionamento do EB foram realizados no Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia/UFMG sob supervisão da Prof^a Dra Maria das Graças Lins Brandão.

3.2.5 Identificação de compostos no extrato bruto e nas frações semipurificadas

a) *Cromatografia em camada delgada (CCD)*: Para a identificação dos compostos no EB e nas frações semipurificadas (FAE, FB e FAq), 20 mg de cada amostra foram dissolvidos em 2 ml de metanol. Uma pequena alíquota (10 – 20 µl) foi aplicada em uma placa de alumínio ou vidro coberta com sílica gel. Essa placa foi imersa em uma cuba cromatográfica contendo o eluente. Após a eluição, a placa foi retirada da cuba e evaporada à temperatura ambiente. Em seguida, a mesma foi borrifada com o revelador apropriado para a identificação dos possíveis compostos encontrados nas folhas da *E. macrophyllus*.

Para a identificação de flavonóides, o eluente utilizado foi uma mistura de acetato de etila : ácido acético : ácido fórmico : água (100:11:11:26). A placa foi revelada com difenilboratoetilamina 1% em metanol (NP) seguido de polietilenoglicol 4000 1% em etanol (PEG). A placa foi aquecida por 5 min, a 105 °C. Finalmente, a placa foi visualizada em luz ultravioleta (UV) a 365 nm.

b) *Cromatografia Líquida de alta eficiência (CLAE)*: A CLAE foi utilizada com o intuito de identificar a possível presença de flavonóides no EB e nas frações semipurificadas de *E. macrophyllus*. O cromatógrafo por nós utilizado (Agilent®) constitui de bomba quaternária, auto injetor, forno com temperatura programável, detector DAD (*diode array detector*) e programa (*software*) para captura e análise dos dados.

As condições cromatográficas utilizadas para a identificação de flavonóides foram: **Coluna**, LiChrospher C18, 250 x 4.6 mm, 5 µm (Merck), 30 °C com pré-coluna; **detecção**, 270 nm; **volume de injeção**; 4 µl; **fluxo**, 1 ml/min; **sistema de solvente**, acetonitrila 100% (ACN) (**A**) : ácido trifluoroacético (TFA) 0,05% (**B**); **gradiente**: 10% a 30% de **A** de 0 a 35 min, 30% a 100% de **A** de 35 a 40 min, 100% de **A** de 40 a 50 min. Reequilíbrio da coluna: 100% a 10% de **A** de 50-55 min, 10% de **A** de 55-60 min.

b.1) *Padrões de flavonóides*: A vitexina, isovitexina e orientina foram os flavonóides utilizados como padrões pela a determinação de tempos de retenção.

Cada um desses compostos (1 mg) foi dissolvido, separadamente, em 1 ml do sistema de solvente (ACN 100% : TFA 0,05% :: 50 : 50) usado na CLAE de modo a se obter uma concentração final de 1 mg/ml.

b.2) *Amostras*: No preparo das amostras para posterior identificação por CLAE (HPLC), utilizou-se 10 mg do EB ou das frações semipurificadas (FAE, FB e FAq) que foram dissolvidos em 10 ml do sistema solvente (ACN 100% : TFA 0,05% :: 50 : 50) usado na CLAE (HPLC) de modo a se obter, também, uma concentração final de 1 mg/ml.

3.3 Protocolos experimentais

Este trabalho foi desenvolvido seguindo, basicamente, 2 protocolos experimentais:

Protocolo I. Efeito de doses crescentes do chá das folhas de *E. macrophyllus*, EB e frações FAE, FB e FAq sobre o fluxo urinário em ratos normais.

Protocolo II. Efeito do EB e das frações FAE, FB e FAq sobre a função renal em ratos normais e em ratos com NTA induzida pela gentamicina.

3.3.1 Protocolo I

a) *Administração da infusão das folhas (Chá)*: Os ratos foram pesados e receberam, por gavagem, 4 ml para cada 100 g de peso corporal (expansão de volume de 4%), de NaCl contendo ou não (controle) a infusão de folhas (conforme preparação descrita no item 3.2.3) em proporção de 2,5%, 5% e 10% (p/v).

b) *Administração do extrato bruto ou das frações semipurificadas*: Os ratos foram pesados e receberam, por gavagem, 4 ml para cada 100 g de peso corporal (expansão de volume de 4%), de NaCl contendo ou não (controle) o EB ou as frações FAE, FB ou FAq (conforme preparação descrita no item 3.2.4) em doses que variaram de 10 a 1000 mg/kg.

Ao final dos procedimentos acima (a e b), os ratos foram colocados, individualmente, em gaiolas metabólicas desprovidas de água e ração. O volume de urina foi medido a intervalos de 30 min, por um período de 3 h (180 min). O esquema resumido do **protocolo I** encontra-se esquematizado na Figura 4.

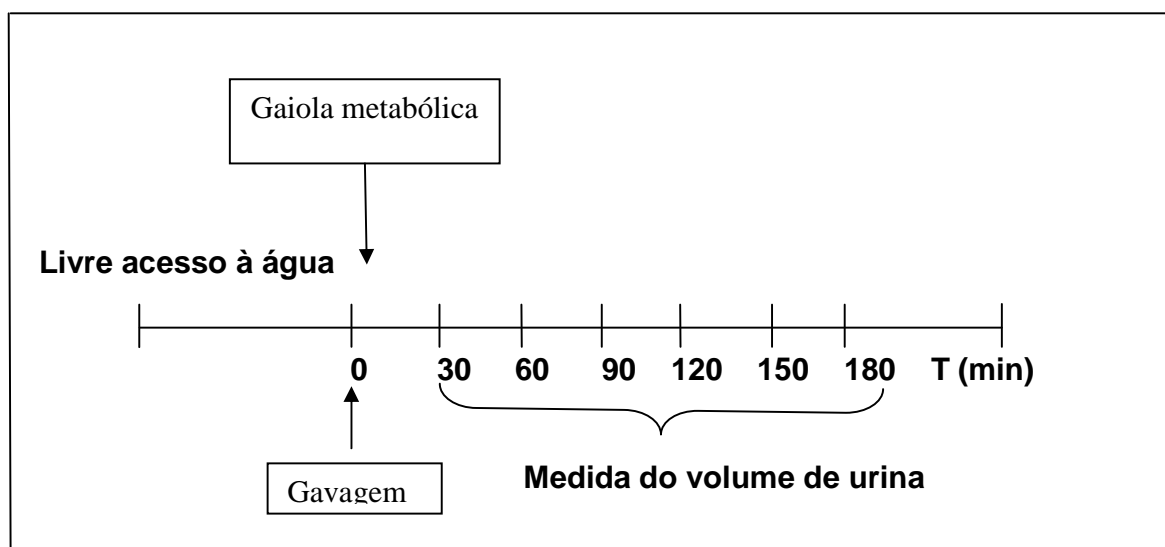


Figura 4. Esquema do protocolo I para o estudo do efeito de doses crescentes do chá das folhas de *E. macrophyllus*, EB e das frações semipurificadas FAE, FB e FAq sobre a diurese em ratos normais.

3.3.2 Protocolo II

Nesse protocolo, os ratos foram colocados, individualmente, em gaiolas metabólicas durante 4 dias para aclimação e foram, em seguida, tratados com gentamicina (GT, Gentatec®, 80 mg/kg/dia, 0,1 ml/100g de peso corporal da solução 40 mg/ml), por 5 dias. Os animais receberam GT (40 mg/kg), por via subcutânea (s.c.), 2 vezes ao dia, sendo, a primeira dose, às 09:00h da manhã e a segunda, às 17:00h. Ratos normais foram submetidos ao mesmo procedimento recebendo, no entanto, injeção de NaCl 0,9% (0,1 ml/100 g de peso corporal). Ao término do indução da NTA com GT, os ratos foram volume-expandidos (4% do peso corporal, administrado por gavagem) com NaCl 0,9% contendo ou não (grupo GT Sal) EB (30mg/kg), FAE (10mg/kg) ou FB (10mg/kg), 1 vez/dia, durante 7 dias. Os ratos normais também foram volume-expandidos com NaCl 0,9% contendo ou não (grupo Sal Sal) o EB ou as frações. Após os 7 dias de tratamento, os ratos foram sacrificados e amostras de urina, sangue e rins foram coletadas para análises posteriores. Durante os períodos de aclimação (ACL), volume de urina, a ingestão de água e o peso dos animais foram medidos diariamente. Para análises posteriores, uma alíquota de urina (~1 ml) foi coletada, em tubos de microcentrífuga (*ependorf*), no fim do período de ACL (dia 4), no fim do período de indução de NTA com GT (dia 10) e nos dias 14 e 18 durante o

tratamento ou não com EB, FAE ou FB. Amostras de sangue (~ 1 ml em tubos heparinizados) também foram coletadas de uma veia da cauda, nos mesmos dias de coleta de urina. Para a obtenção do plasma, o sangue foi centrifugado a 4000 rpm, por 10 min, à temperatura ambiente. As amostras de urina e plasma foram armazenadas a -20 °C para medida posterior de creatinina, uréia, osmolalidade, Na⁺ e K⁺ e proteinúria. O **protocolo II** para indução da NTA com GT e tratamento com EB, FAE ou FB encontra-se esquematizado na Figura 5.

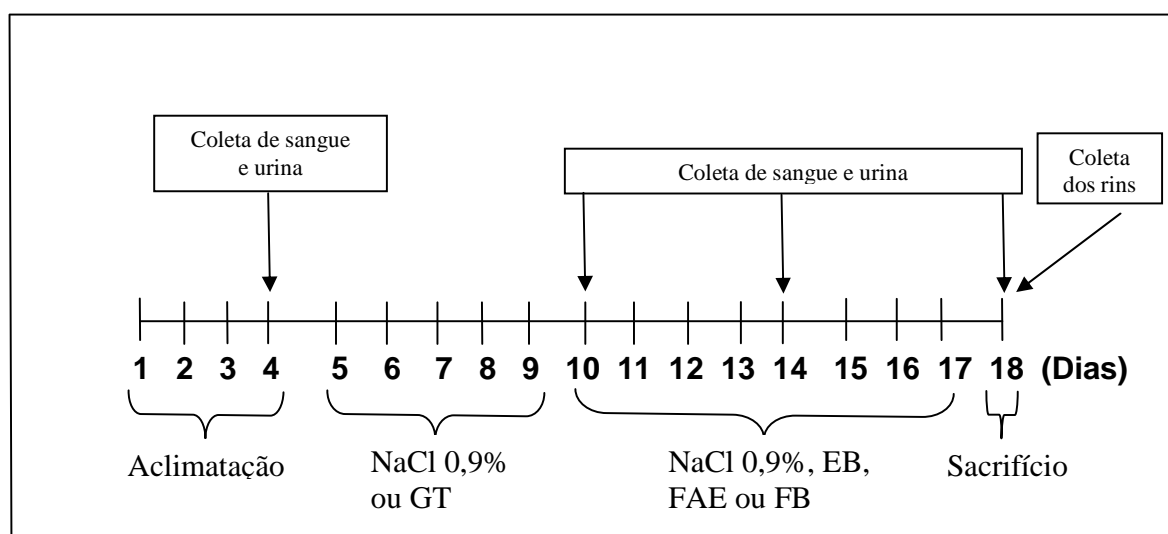


Figura 5. Esquema do protocolo II para o estudo do efeito do EB e das frações FAE e FB sobre a função renal em ratos normais e em ratos com NTA induzida por GT.

Para analisar as alterações morfológicas decorrentes da NTA e dos possíveis efeitos do EB e das frações FAE ou FB ao término do protocolo experimental, os animais foram anestesiados com tiopental sódico (40 mg/kg, i.p.) e colocados em decúbito dorsal sobre uma mesa. Uma incisão longitudinal no abdome foi realizada e as vísceras abdominais foram deslocadas de modo que o rim direito ficasse exposto. Com auxílio de uma tesoura, os rins direito e esquerdo foram removidos, decapsulados e pesados. O rim direito foi colocado em solução de formol tamponado a 10% sendo, em seguida, enviado para o Laboratório de Patologia Comparada - ICB/UFMG, onde foram submetidos às técnicas convencionais de coloração (eosina-hematoxilina) para análises histológicas dos mesmos.

3.4 Grupos experimentais

Do total de 8 grupos experimentais, 4 foram compostos por ratos normais e os outros 4 por ratos com NTA induzida com GT. O procedimento em cada grupo está descrito a seguir.

Grupo **Sal Sal**: os ratos receberam injeção de NaCl 0,9% (0,1 ml/100 g de peso corporal, s.c.), 2 vezes/dia, por 5 dias. Em seguida, receberam NaCl 0,9% (4% do peso corporal, gavagem), 1 vez/dia, por 7 dias;

Grupo **Sal EB**: os ratos receberam injeção de NaCl 0,9% (0,1 ml/100 g de peso corporal, s.c.), 2 vezes/dia, por 5 dias. Em seguida, receberam NaCl 0,9% (4% do peso corporal, gavagem) contendo EB (30 mg/kg), 1 vez/dia, por 7 dias;

Grupo **Sal FAE**: os ratos receberam injeção de NaCl 0,9% (0,1 ml/100 g de peso corporal, s.c.), 2 vezes/dia, por 5 dias. Em seguida, receberam NaCl 0,9% (4% do peso corporal, gavagem) contendo FAE (10 mg/kg), 1 vez/dia, por 7 dias;

Grupo **Sal FB**: os ratos receberam injeção de NaCl 0,9% (0,1 ml/100 g de peso corporal, s.c.), 2 vezes/dia, por 5 dias. Em seguida, receberam NaCl 0,9% (4% do peso corporal, gavagem) contendo FB (10 mg/kg), 1 vez/dia, por 7 dias;

Grupo **GT Sal**: os ratos receberam injeção de gentamicina 40 mg/ml (0,1 ml/100 g de peso corporal, s.c.), 2 vezes/dia (80 mg/kg/dia), por 5 dias. Em seguida, receberam NaCl 0,9% (4% do peso corporal, gavagem), 1 vez/dia, por 7 dias;

Grupo **GT EB**: os ratos receberam injeção de gentamicina 40 mg/ml (0,1 ml/100 g de peso corporal, s.c.), 2 vezes/dia (80 mg/kg/dia), por 5 dias. Em seguida, receberam NaCl 0,9% (4% do peso corporal, gavagem) contendo EB (30 mg/kg), 1 vez/dia, por 7 dias;

Grupo **GT FAE**: os ratos receberam injeção de gentamicina 40 mg/ml (0,1 ml/100 g de peso corporal, s.c.), 2 vezes/dia (80 mg/kg/dia), por 5 dias. Em seguida, receberam NaCl 0,9% (4% do peso corporal, gavagem) contendo FAE (10 mg/kg), 1 vez/dia, por 7 dias;

Grupo **GT FB**: os ratos receberam injeção de gentamicina 40 mg/ml (0,1 ml/100 g de peso corporal, s.c.), 2 vezes/dia (80 mg/kg/dia), por 5 dias. Em seguida, receberam NaCl 0,9% (4% do peso corporal, gavagem) contendo FB (10 mg/kg), 1 vez/dia, por 7 dias.

A Tabela 1 sumariza os procedimentos durante o período de indução da NTA com GT e o tratamento posterior com EB ou com as frações FAE e FB.

Tabela 1. Sumário dos grupos experimentais utilizados na execução do Protocolo II.

Grupos experimentais	Procedimento durante a indução da NTA	Procedimento durante o tratamento
Sal Sal	NaCl 0,9%	Salina (NaCl 0,9%)
Sal EB	NaCl 0,9%	EB (30 mg/kg)
Sal FAE	NaCl 0,9%	FAE (10 mg/kg)
Sal FB	NaCl 0,9%	FB (10 mg/kg)
GT Sal	GT (80 mg/kg/dia)	Salina (NaCl 0,9%)
GT EB	GT (80 mg/kg/dia)	EB (30 mg/kg)
GT FAE	GT (80 mg/kg/dia)	FAE (10 mg/kg)
GT FB	GT (80 mg/kg/dia)	FB (10 mg/kg)

3.5 Procedimentos analíticos para avaliação da função renal

3.5.1 Dosagem de creatinina

O RFG foi estimado através do *clearance* da creatinina. Esta foi determinada, nas amostras de urina e plasma, utilizando um kit da Bioclin (Quibasa). A reação, feita em **duplicata** e de acordo com as instruções do fornecedor, se fundamenta na reação da creatinina com a solução de ácido pícrico, em meio alcalino.

Preparo da Curva Padrão

Uma curva padrão para a creatinina foi construída utilizando 3 concentrações da mesma: Padrão 1, 3 mg/dl; padrão 2, 1,0 mg/dl e padrão 3, 0,5 mg/dl. A Figura 6 mostra uma curva padrão típica conforme obtida para a creatinina.

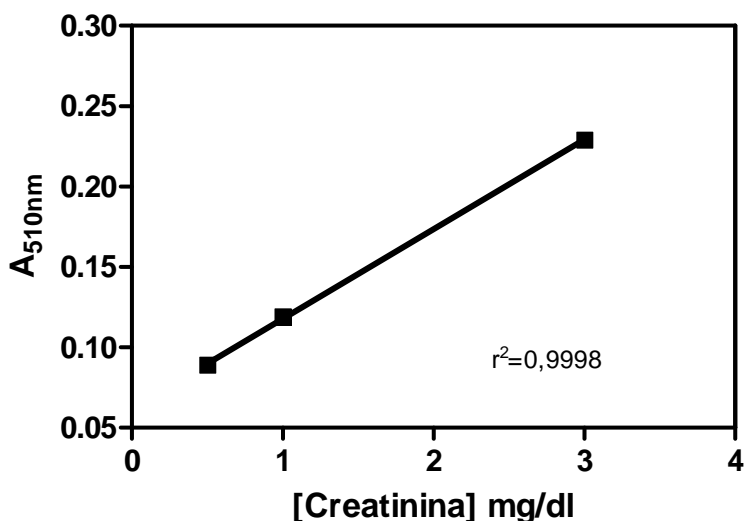


Figura 6. Curva padrão típica de creatinina.

Dosagem de creatinina na urina: As amostras diluídas foram homogeneizadas e incubadas em banho-maria a 37 °C, por 10 min. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 510 nm.

Dosagem creatinina no plasma: As amostras foram homogeneizadas e incubadas em banho-maria a 37 °C, por 10 min. Uma primeira leitura foi feita, em espectrofotômetro, a 510 nm e a absorbância foi denominada de A1. Após essa leitura, foi adicionado 0,040 ml do reagente 4 nas amostras de plasma e no branco. As reações foram homogeneizadas e mantidas em repouso, por 5 min, à temperatura ambiente (15 a 30 °C). Uma 2ª leitura a 510 nm, denominada A2, foi realizada tanto nas reações do plasma como do branco. Esta reação é estável por 30 min. A concentração de creatinina no plasma, em mg/dl, é igual a $(A1 - A2 / \text{absorbância padrão}) \times 3$.

A Tabela 2 sumariza os meios de reação necessários durante a dosagem de creatinina.

Tabela 2. Sumário do meio de reação para dosagem de creatinina.

	Plasma (ml)	Urina (ml)	Água destilada (ml)	Padrão (ml)	Reagente 3 (ml)	Reagente 2 (ml)	Reagente 4 (ml)
Branco	-	-	0,100	-	0,800	0,2	0,04
Padrão 1- 3mg/dl	-	-	-	0,100	-	-	-
Padrão 2- 1mg/dl	-	-	-	0,200	-	-	-
Padrão 3- 0,5mg/dl	-	-	-	0,400	-	-	-
Amostra de Plasma*	0,100	-	-	-	0,800	0,2	0,04
Amostra de Urina**	-	0,10	-	-	0,800	0,2	-

*Utilizar 100 µL de plasma para a dosagem. **Urina (24h) deve ser diluída 1:25. Reagente 1, solução padrão de creatinina (3mg/dl); reagente 2, solução de ácido pícrico (60 mmol/l); reagente 3, solução alcalina com NaOH (110mmol/l), Na₂CO₃ (75 mmol/l) e surfactante; reagente 4, solução ácida de CH₃COOH (12,25 mol/l).

O RFG foi estimado utilizando a equação a seguir:

Clearance de Creatinina (ml/min):

$$([\text{Creatinina}]_{\text{urina}} \times \text{Fluxo urinário}) / [\text{Creatinina}]_{\text{plasma}}$$

3.5.2 Dosagem da Proteinúria Total:

A proteinúria, determinada em amostras de urina de 24h, foi medida utilizando o kit comercial SensiProt (Labtest®, Lagoa Santa, MG, Brasil) e de acordo com instruções do fornecedor. A proteína excretada na urina foi expressa em mg/24h. A Tabela 3 sumariza os meios de reação necessários durante a dosagem de proteína.

Tabela 3. Sumário do meio de reação para dosagem de proteína na urina.

	Branco	Teste	Padrão
Amostra	---	50µl	---
Água deionizada	50µl	-	-
Padrão (50mg/dl)	-	-	50 µl
Reagente de cor	1, 0 ml	1, 0 ml	1, 0 ml

Reagente 1, reagente de cor (vermelho de pirogalol 60 µmol/l, molibdato de sódio 40µmol/ , oxalato de sódio 1mmol/l, tampão 50 mmol/l, pH 2,5, octil fenol polioxietanol 0,1% e preservativos); reagente 2, solução padrão (50mg/dl) com azida sódica 0,05%;

Após a preparação da mistura de reação, os tubos foram colocados em banho-Maria a 37 °C, por 5 min. A absorbância das amostras e do padrão foi determinada a 600 nm, acertando-se o zero com o branco.

[Proteína]_{urina} (mg/dL) = Absorbância da amostra x 50 / Absorbância do padrão

3.5.3 Dosagem de Uréia

A concentração de uréia plasmática, foi determinada através do kit comercial Uréia CE (Labtest®, Lagoa Santa, MG, Brasil) e de acordo com as instruções do fornecedor. A

Tabela 4 sumariza os meios de reação necessários durante a dosagem da uréia plasmática.

Tabela 4. Sumário do meio de reação para dosagem de uréia no plasma.

	Branco	Teste	Padrão
Amostra	---	10µl	---
Padrão (50mg/dl)	-	-	10 µl
Urease tamponada	1, 0 ml	1, 0 ml	1, 0 ml
Misturar e incubar em banho-Maria a 37 °C, por 5 min			
	Branco	Teste	Padrão
Oxidante de uso	1, 0 ml	1, 0 ml	1, 0 ml

Reagente, urease (contém tampão fosfato 10 mmol/l e urease 268Ku/l); reagente 2, tampão estoque (contém tampão fosfato 10 mmol/l, pH 6,9, salicilato de sódio 312 mmol/l e nitroprussiato de sódio 16,8 mmol/l; reagente 3, oxidante (contém NaOH 2,8 mol/l e hipoclorito de sódio 121mmol/l); padrão de uréia 70 mg/dl.

A absorvância das amostras e do padrão foi determinada a 600 nm, acertando-se o zero com o branco.

$$[\text{Uréia}]_{\text{plasma}} \text{ (mg/dL)} = \text{Absorvância da amostra} \times 70 / \text{Absorvância do padrão}$$

3.5.4 Dosagem de sódio e potássio

As concentrações de sódio e potássio, nas amostras de urina e plasma, foram determinadas por fotometria de chama (Celm, FC 180), usando padrão contendo 140 mEq/l de Na^+ e 5 mEq/l de K^+ preparado em água destilada.

Todas as amostras foram diluídas 200 vezes em água deionizada. Para isso, alíquotas de 15 μl foram diluídas em 3 ml de água destilada sendo, a dosagem de cada amostra, feita em duplicata. Conhecendo-se as concentrações plasmática e urinária de Na^+ e K^+ , alguns parâmetros podem ser quantitativamente avaliados, conforme as equações:

$$\text{FE}_{\text{Na}^+} (\%) = \text{QE}_{\text{Na}^+} / \text{QF}_{\text{Na}^+} \times 100,$$

$$\text{FE}_{\text{K}^+} (\%) = \text{QE}_{\text{K}^+} / \text{QF}_{\text{K}^+} \times 100, \text{ onde}$$

FE, fração de excreção; QE, quantidade excretada; QF, quantidade filtrada.

3.5.5 Determinação das Osmolalidades plasmática e urinária

A determinação das osmolalidades plasmática e urinária foi feita através de osmometria de congelamento (microosmetete, Precision System Inc.) usando padrões com osmolalidades apropriadas para as amostras de urina e plasma (100, 290 e 500 mOsm/kg). Conhecendo-se as osmolalidades plasmática e urinária, alguns parâmetros podem ser quantitativamente avaliados, conforme as equações:

$$C_{\text{osm}} \text{ (ml/min)} = \frac{\text{Osmolalidade}_{\text{urina}} (\mu\text{Osm/ml}) \times \text{FU} \text{ (ml/min)}}{\text{Osmolalidade}_{\text{plasmática}} (\mu\text{Osm/ml})}$$

$$C_{\text{H}_2\text{O}} \text{ (ml/min)} = \text{FU} \text{ (ml/min)} - C_{\text{osm}} \text{ (ml/min)}.$$

C, *clearance*; osm, osmolar; $C_{\text{H}_2\text{O}}$, *clearance* de água livre.

Outros parâmetros renais avaliados:

A fração de excreção de água (FE_{H_2O}) foi avaliada segundo a equação:

$$FE_{H_2O} (\%) = FU / RFG \times 100, \text{ sendo}$$

FU= fluxo urinário e RFG = Ritmo de filtração glomerular, ambos em ml/min.

3.5.6 Peso dos rins

Após o sacrifício, os rins direito e esquerdo foram coletados, dissecados e os seus determinados por gravimetria usando uma balança semianalítica.

3.6 Análise morfológica renal

O rim direito de ratos de todos os grupos foram submetidos à análise histológica. Técnicas convencionais de coloração (Hematoxilina-eosina) foram usadas na preparação das lâminas. O corte dos blocos foram não seriados com a intenção de visualização de néfrons diferentes; as fotos foram capturadas no aumento de 40 vezes.

3.7 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média ($X \pm$ EPM). De acordo com a adequação, os dados foram analisados por ANOVA seguida do teste de Dunnett ou Two-way-ANOVA seguida do teste de Bonferroni. Quando conveniente, o teste "t" de Student para amostras não pareadas também foi utilizado. Também de acordo com a conveniência, a regressão linear e não linear também foram utilizadas. Para as análises estatísticas foi utilizado o programa GraphPad Prism, versão 5 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA).

4 RESULTADOS

Os dados a serem apresentados foram divididos em 3 tópicos, conforme a seguir:

- 4.1 Controle de qualidade, obtenção e identificação do extrato bruto etanólico das folhas de *E. macrophyllus* (EB) e de suas frações semipurificadas: fração acetato de etila (FAE), fração N-butanólica (FB) e fração aquosa (FAq);
- 4.2 Efeito das folhas de *E. macrophyllus*, sob a forma de chá e do EB bem como de suas frações semipurificadas, sobre a diurese em ratos normais;
- 4.3 Efeito do EB e de suas frações semipurificadas FAE e FB sobre a função renal em ratos com necrose tubular aguda induzida por gentamicina.

4.1 Controle de qualidade, obtenção e identificação do extrato bruto das folhas de *E. macrophyllus* e de suas frações semipurificadas

4.1.1 Análise microscópica e da umidade das folhas de *E. macrophyllus*

A avaliação microscópica foi realizada para visualização de estruturas microscópicas que são características das folhas de *E. macrophyllus*. Essas estruturas, encontradas no pó das folhas da espécie, foram os pelos tectores (dado não mostrado). Esta observação está de acordo com as estruturas especificadas na monografia da espécie encontrada na Farmacopéia Brasileira (1ª Edição, 1926).

A Tabela 5 mostra os resultados de umidade encontrados nas folhas secas e trituradas de *E. macrophyllus* utilizando o método gravimétrico, que se encontra descrito na Farmacopéia Brasileira (Métodos Gerais, 4ª Edição).

Tabela 5. Porcentagem de umidade encontrada em amostras distintas de folhas secas de *E. macrophyllus*

Amostras de folhas secas de <i>E. macrophyllus</i>	Umidade %
Amostra 1	11,15
Amostra 2	11,60
Amostra 3	11,55
Média	11,43

4.1.2 Rendimentos obtidos no processo de preparação do extrato bruto e após seu fracionamento

O processo utilizado na preparação do EB das folhas de *E. macrophyllus* foi a percolação a frio, que é o método padronizado e descrito na Farmacopéia Brasileira (4ª Edição). O extrato foi obtido a partir de 1.159,02 g de pó das folhas extraído com álcool etílico 80 GL°. O rendimento encontrado após o processo de 6 percolações (extrações) sucessivas foi de 23% (p/p).

A Tabela 6 mostra a eficiência do processo de extração, avaliada através da pesagem do resíduo seco, realizada durante todo o processo de extração.

Tabela 6. Eficiência do processo de preparação do EB das folhas de *E. macrophyllus* após cada uma das 6 extrações.

Extração (percolação) n°	Resíduo seco % (p/p)	Eficiência da extração %
1	1,61	58,52
2	0,67	24,35
3	0,20	7,27
4	0,15	5,42
5	0,095	3,45
6	0,026	0,95
Total R.S= 2,751%		100%

Após o processo de percolação, o percolato foi concentrado a vácuo até secagem completa, obtendo-se o extrato bruto. Em seguida, esse extrato foi submetido a um fracionamento que teve por objetivo separar componentes de acordo com suas características de polaridade. O fracionamento foi a partir de 229,08g do EB.

O rendimento obtido com os diferentes solventes encontra-se na Tabela 7. O total de material extraído durante o processo de fracionamento do EB foi de 92% em relação à quantidade de amostra inicial do mesmo (229,08 g).

Tabela 7. Rendimento após o processo de fracionamento do EB das folhas de *E. macrophyllus* utilizando diferentes solventes.

Fração	Rendimento % (p/p)
Hexânica (FH)	33,91
Acetato de Etila (FAE)	2,78
N-Butanólica (FB)	7,88
Aquosa (FAq)	47,46

4.1.3 Identificação de compostos no extrato bruto e nas frações semipurificadas por cromatografia em camada delgada

A Figura 7 mostra o perfil cromatográfico, em CCD, do EB das folhas de *E. macrophyllus* e de suas frações extraídas com acetato de etila (FAE), N-butanol (FB) e água (FAq). As bandas amarelas fluorescentes, com R_f entre 0,35 e 0,60 encontradas no EB e frações FAE e FB indicam a presença de flavonóides, pois esta coloração é específica para estes compostos após revelação com o revelador específico para os mesmos.

4.1.4 Identificação de compostos no extrato bruto e nas frações semipurificadas por cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi utilizada com a finalidade de identificar a possível presença de flavonóides no EB das folhas de *E. macrophyllus* e em suas frações semipurificadas. Os padrões utilizados e identificados neste sistema cromatográfico foram a isovitexina, vitexina e orientina. Os tempos de retenção para estes padrões foram: orientina, 15,79 min, vitexina, 18,30 min e isovitexina, 18,94 min. A Figura 8 mostra os perfis cromatográficos e os respectivos espectros no ultravioleta dos referidos padrões.

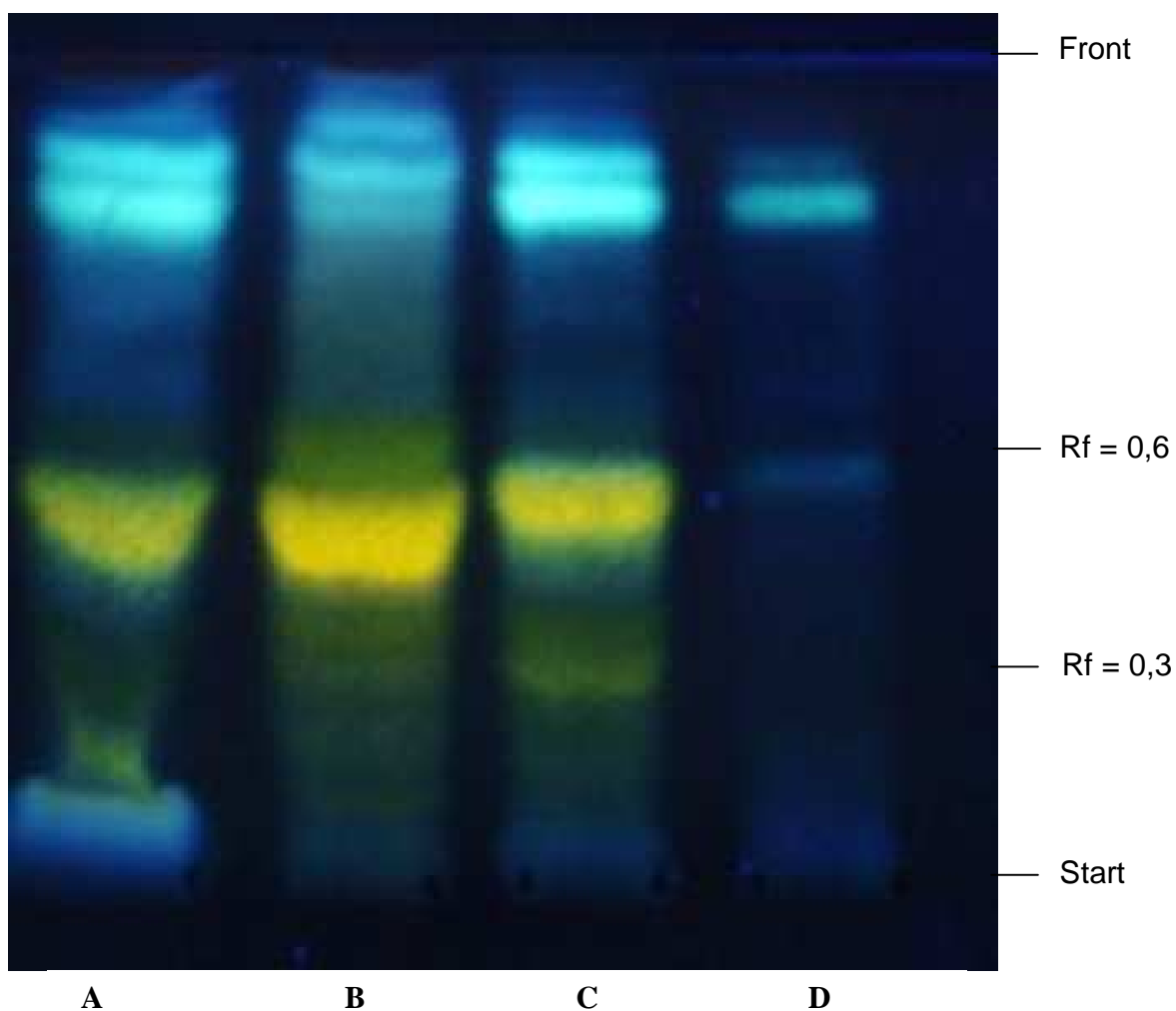


Figura 7. Cromatografia em camada delgada para identificação de flavonóides. **A**, EB das folhas de *E. macrophyllus*; **B**, FAE; **C**, FB; **D**, FAq. *Eluente*, acetato de etila, ácido acético, ácido fórmico e água (100:11:11:26); *revelador*, difenilboratoetilamina a 1% em metanol seguido de polietilenoglicol 4000 a 1% em etanol (PEG); *visualização*, luz ultravioleta a 365 nm.

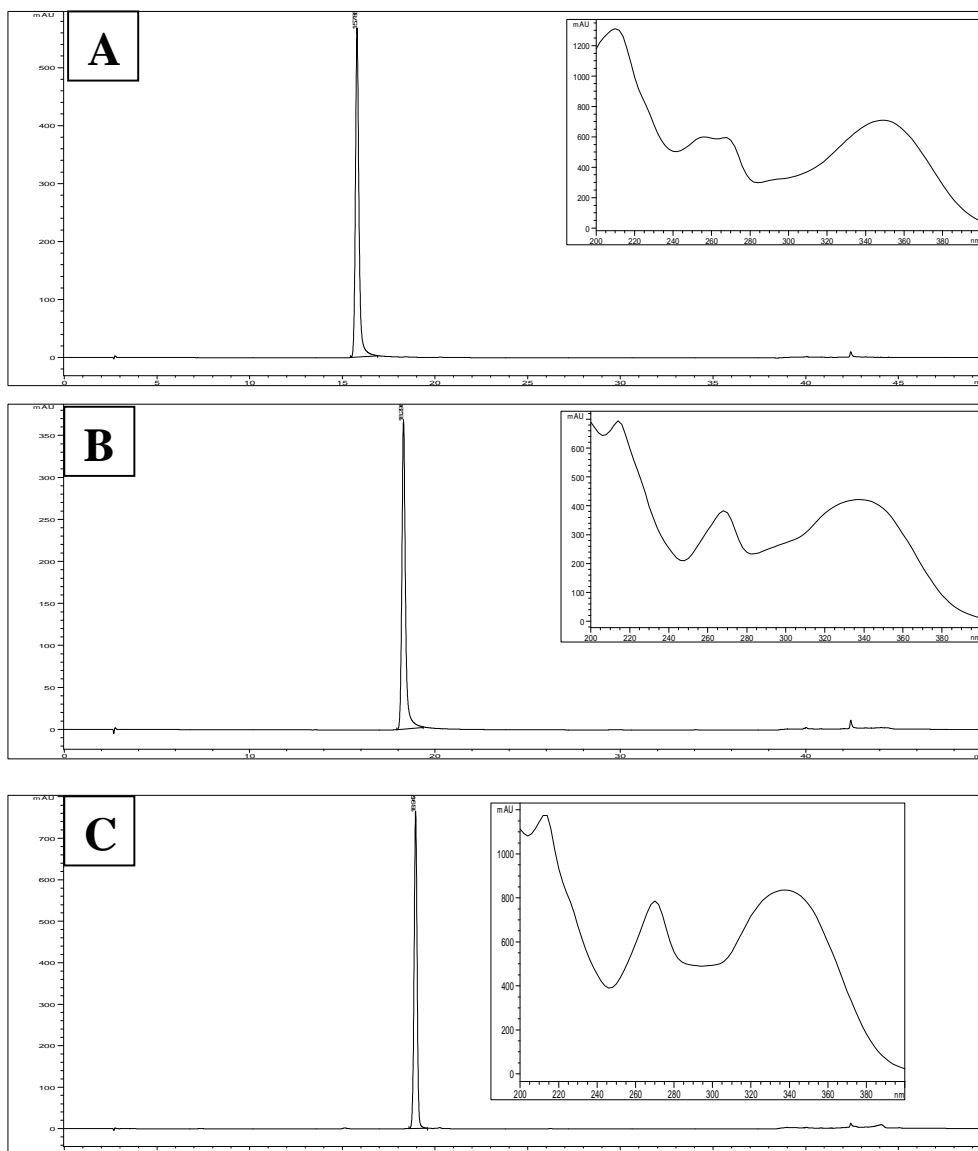


Figura 8. Cromatografia líquida de alta eficiência dos padrões de flavonóides orientina (A), vitexina (B) e isovitexina (C). *Coluna*, LiChrospher C18, 250 x 4.6 mm, 5 μ m, 30 $^{\circ}$ C com pré-coluna; *deteção*, 270 nm; *volume de injeção*, 4 μ l; *fluxo*, 1 ml/min; *sistema solvente*, acetonitrila 100% (solvente A) : ácido trifluoroacético (TFA) operando em gradiente de polaridade. Tempos de retenção: orientina, 15,79 min; vitexina, 18,30 min; isovitexina, 18,94 min. *Insets*: espectros na faixa do ultravioleta (200 a 380 nm) dos referidos padrões.

O cromatograma do EB das folhas de *E. macrophyllus*, conforme obtido por CLAE (Fig. 9), apresentou vários picos, sendo que um deles, de amplitude considerável, eluiu com tempo de retenção (18,36 min) similar ao tempo de retenção observado para o flavonóide padrão vitexina (18,30 min) (Fig. 8B).

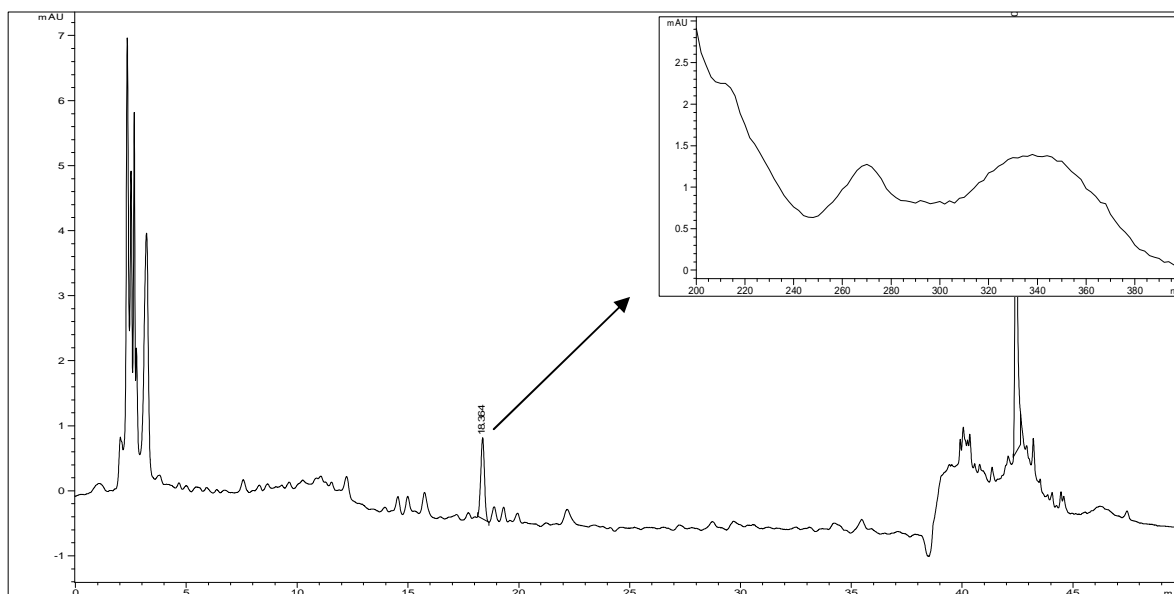


Figura 9. Cromatografia líquida de alta eficiência do EB das folhas de *E. macrophyllus*. Coluna, solventes e condições de eluição foram as mesmas já descritas na Figura 8. *Inset:* espectro na faixa do ultravioleta (200 a 380 nm) do pico com tempo de retenção (18,36 min) similar ao do flavonóide padrão vitexina (18,30 min).

Os cromatogramas das frações FAE (Fig. 10) e FB (Fig. 11) também apresentaram diversos picos sendo que, alguns deles, eluíram com tempos de retenção similares aos padrões de flavonóides. No cromatograma da FAE, os picos correspondentes aos flavonóides orientina, vitexina e isovitexina apresentaram tempos de retenção de 15,58, 18,14 e 18,67 min, respectivamente. Já na fração FB, os tempos de retenção foram de 15,55, 18,08 e 18,62 min para a orientina, vitexina e isovitexina, respectivamente. Estes tempos de retenção foram muito similares aos observados para os 3 flavonóides padrões (Fig. 8).

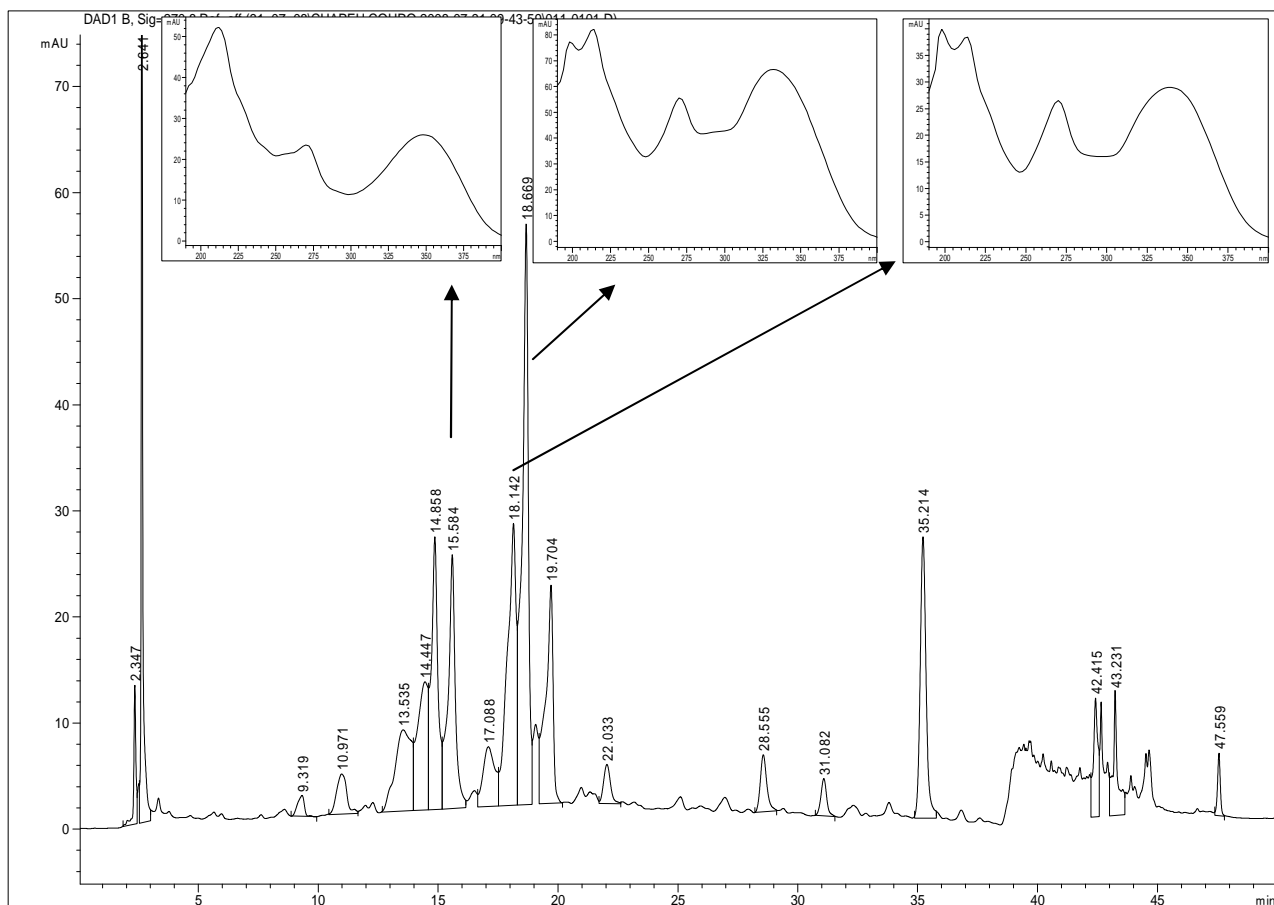


Figura 10. Cromatografia líquida de alta eficiência da fração FAE extraída do EB das folhas de *E. macrophyllus*. Coluna, solventes e condições de eluição foram as mesmas já descritas na Figura 8. *Inset:* espectros na faixa do ultravioleta (200 a 380 nm) de picos com tempo de retenção similares aos dos flavonóides padrão orientina, vitexina e isovitexina.

O cromatograma da fração FAq (Fig. 12), não apresentou nenhum pico com tempo de retenção similar aos padrões de flavonóides. Os picos presentes nesta fração são de compostos de alta polaridade como polifenóis, que são compostos totalmente solúveis em água.

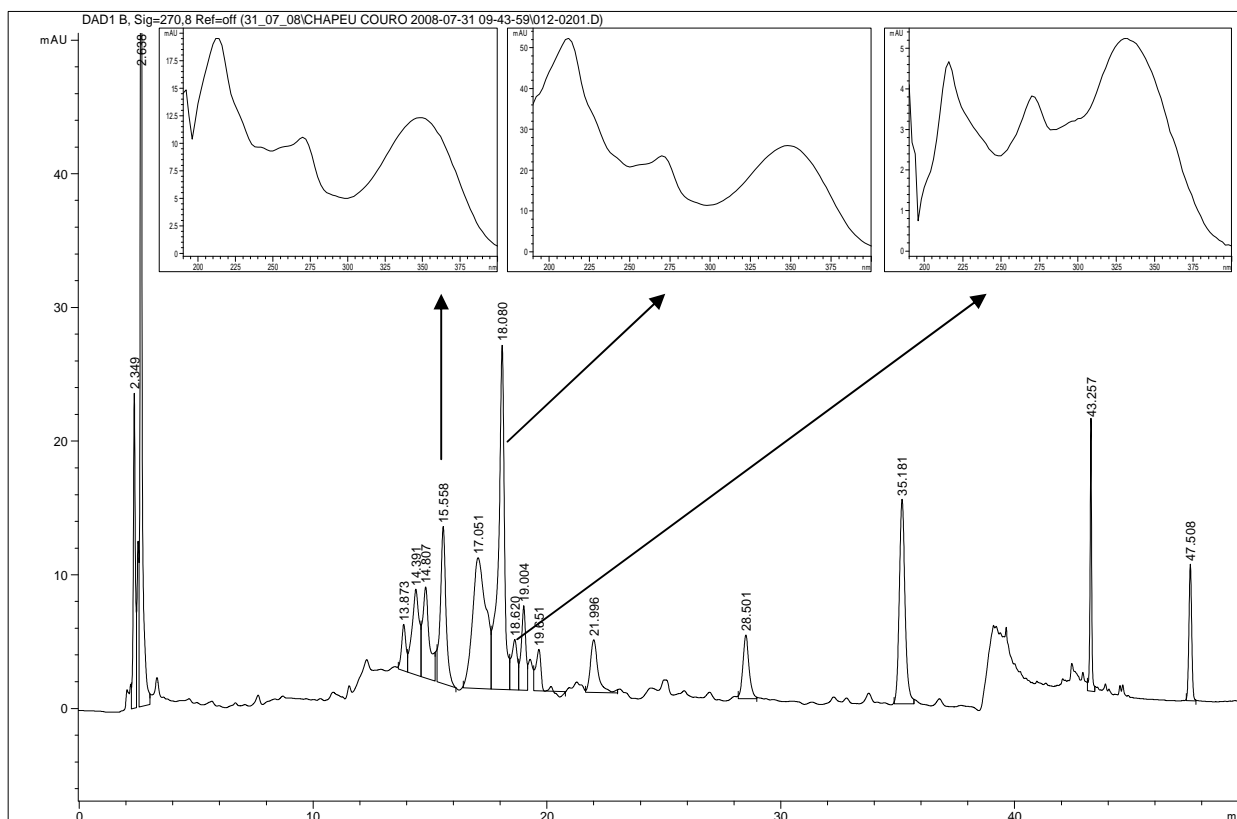


Figura 11. Cromatografia líquida de alta eficiência da fração FB extraída do EB das folhas de *E. macrophyllus*. Coluna, solventes e condições de eluição foram as mesmas já descritas na Figura 8. *Inset:* espectros na faixa do ultravioleta (200 a 380 nm) de picos com tempo de retenção similares aos dos flavonóides padrão orientina, vitexina e isovitexina.

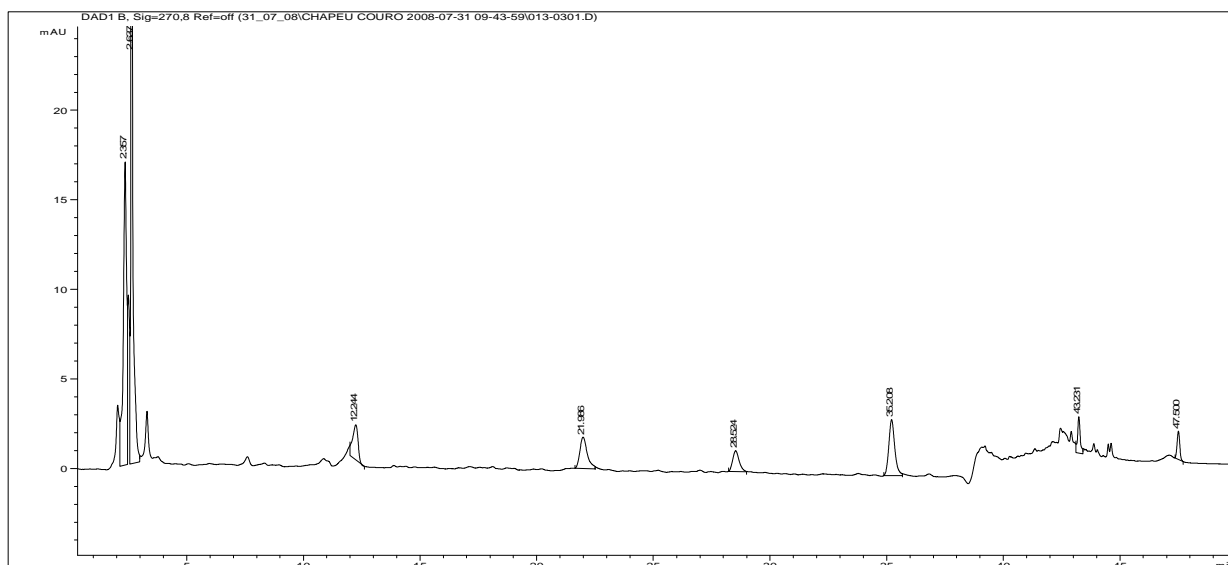


Figura 12. Cromatografia líquida de alta eficiência da fração FAq extraída do EB das folhas de *E. macrophyllus*. Coluna, solventes e condições de eluição foram as mesmas já descritas na Figura 8.

4.2 Efeito das folhas de *E. macrophyllus* sobre a diurese em ratos normais

A fim de validar o protocolo para o estudo da diurese, foi investigado o efeito de substâncias que, reconhecidamente, produzem aumento e diminuição da diurese. As substâncias utilizadas foram o diurético furosemida (FUR, 13 mg/kg) e o hormônio antidiurético (HAD, 200 ng/kg) em ratos normais submetidos à expansão de volume (4% de peso corporal, gavagem). A Figura 13 mostra que a expansão de volume, por si só, já eleva a produção de urina, efeito este que é aumentado e reduzido pela FUR e pelo HAD, respectivamente.

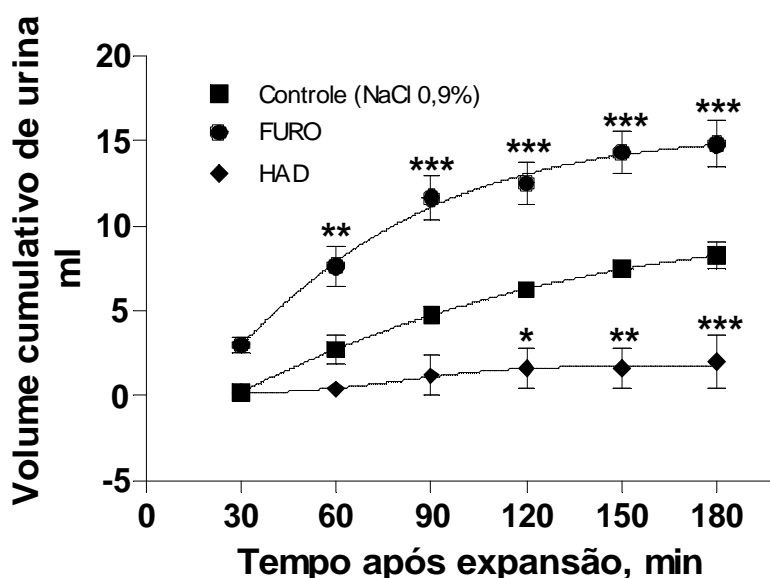


Figura 13. Efeito da furosemida e hormônio antidiurético sobre a diurese em ratos normais. Os ratos ($n = 4-5$) foram volume-expandidos com NaCl 0,9% (4% do peso corporal, gavagem) e o volume de urina foi medido de 30 em 30 min durante 180 min após a expansão. CTL, controle; FUR, furosemida (13 mg/kg); HAD, hormônio antidiurético (200 ng/kg). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs Controle no tempo correspondente. Os valores representam a média \pm EPM.

4.2.1 Efeito da infusão (chá) das folhas de *E. macrophyllus* sobre a diurese em ratos normais

A infusão (chá) das folhas de *E. macrophyllus*, utilizada nessa série experimental, teve o preparo similar ao utilizado na medicina popular brasileira, com exceção do veículo aqui utilizado, que foi NaCl 0,9% ao invés de água.

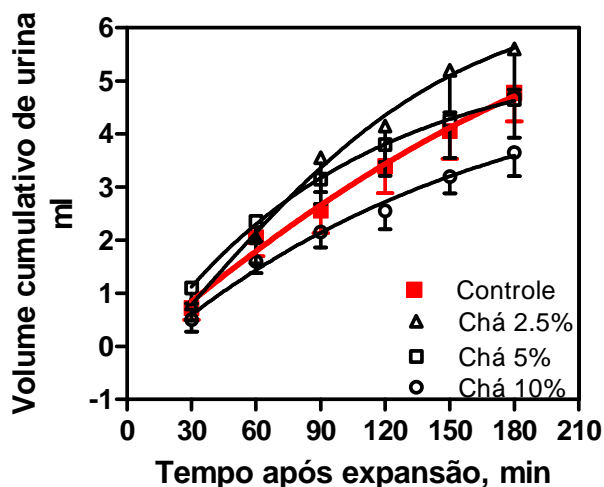


Figura 14. Efeito da infusão (chá) das folhas de *E. macrophyllus*, em diferentes concentrações sobre a diurese em ratos normais (n = 9-10). Volume cumulativo de urina (ml) ao longo de 180 min após expansão de volume (4% do peso corporal, gavagem);

A Figura 14 mostra que essa infusão (chá), em concentrações crescentes (2,5%, 5% e 10% p/p), não afetou de forma significativa a produção de urina, embora um discreto aumento no volume urinário tenha sido observado com o chá a 2,5% aos 150 min após a administração ($5,20 \pm 0,79$ ml) em relação ao grupo controle ($4,05 \pm 0,52$ ml).

4.2.2 Efeito do extrato bruto das folhas de *E. macrophyllus* sobre a diurese em ratos normais

A Figura 15 mostra que doses crescentes de EB, variando de 10 a 1000 mg/kg, exibiram efeito antidiurético. Por exemplo, a dose de 1000 mg/kg apresentou um efeito antidiurético significativo ($3,38 \pm 0,90$ ml), em relação ao grupo controle ($6,39 \pm 0,89$ ml), aos 120 min após a administração. Efeito similar foi observado nas doses de 300 ($4,75 \pm 1,120$ ml) e 1000 mg/kg ($4,63 \pm 0,89$ ml), em relação ao grupo controle ($8,61 \pm 0,99$ ml), também aos 150 min após a administração. E até os 180 min após a administração, o efeito antidiurético ainda podia ser observado para as doses de 300 ($6,25 \pm 1,56$ ml) e 1000 mg/kg ($5,94 \pm 1,05$ ml), em relação ao grupo controle ($10,22 \pm 1,05$ ml). A Figura 15B mostra que o efeito do EB ocorre de maneira dose-dependente.

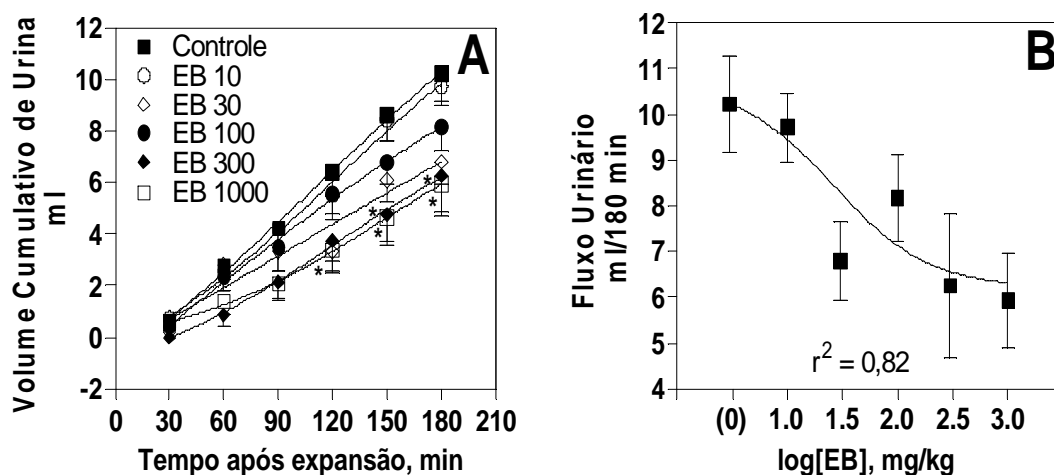


Figura 15. Efeito de doses crescentes de EB das folhas de *E. macrophyllus* sobre a diurese em ratos ($n = 4-9$). **A**, Volume cumulativo de urina (ml) ao longo de 180 min após expansão de volume (4% do peso corporal, gavagem); **B**, Curva dose-resposta (dose em mg/kg vs fluxo urinário em ml/180 min). EB, extrato bruto. (300 e 1000 mg/kg) * $p < 0,05$ vs Controle no tempo correspondente. Os valores representam a média \pm EPM.

4.2.3 Efeito de frações semipurificadas do extrato bruto das folhas de *E. macrophyllus* sobre a diurese em ratos normais

Do processo de fracionamento do extrato bruto foram obtidas 4 frações, sendo que 3 das mesmas foram testadas quanto a um possível efeito sobre a diurese. A Figura 16A mostra que a fração acetato de etila (FAE) não afetou, significativamente, o volume de urina, embora a curva de volume cumulativo de urina vs tempo tenha sido deslocada para baixo para todas as doses administradas. As doses de 10 ($4,10 \pm 1,23$ ml) e de 30 mg/kg ($4,0 \pm 1,92$ ml) promoveram uma maior queda no volume cumulativo de urina (180 min), em relação ao grupo controle ($6,75 \pm 1,01$ ml).

A fração N- butanólica (FB), também não afetou, de maneira significativa, o volume cumulativo de urina. No entanto, como se pode observar na Figura 16B, doses mais baixas, como 10 ($7,60 \pm 1,12$ ml) e 30 mg/kg ($7,10 \pm 1,25$ ml) tendem

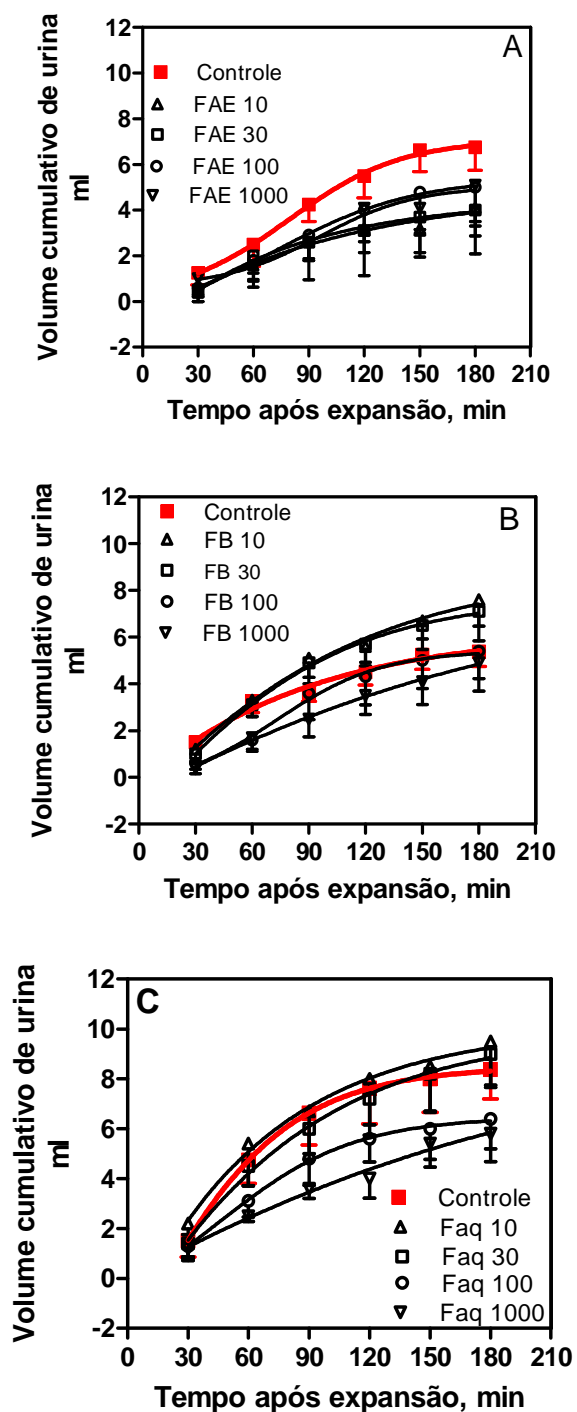


Figura 16. Efeito de doses crescentes de FAE (painel superior), FB (painel mediano) e FAq (painel inferior) obtidas do EB das folhas de *E. macrophyllus* sobre a diurese em ratos ($n = 5$). **A, B e C**, volume cumulativo de urina (ml) ao longo de 180 min após expansão de volume (4% do peso corporal, gavagem) na presença das diferentes frações conforme indicadas nas Figuras;. FAq, fração aquosa; FAE, fração acetato de etila; FB, fração N-butanólica. Os valores representam a média \pm EPM.

a deslocar a curva de volume cumulativo de urina vs tempo para cima e na dose de 100 ($5,40 \pm 1,18$ ml) e 1000 mg/kg ($4,90 \pm 1,21$ ml) tendem a deslocar a curva para baixo, em relação ao grupo controle ($5,37 \pm 0,62$ ml). Pela Figura 16C pode-se observar que diferentes doses de FAq não afetaram de forma significativa, o volume de urina, embora a curva de volume cumulativo de urina vs tempo tenha sido deslocada para baixo pela administração de 100 e 1000 mg/kg da FAq.

4.3 Efeito do extrato bruto das folhas de *E. macrophyllus* e de suas frações FAE e FB sobre o peso corporal, peso dos rins e ingestão de água em ratos com necrose tubular

4.3.1 Peso corporal e peso dos rins

A Figura 17 mostra que o EB e suas frações FAE e FB não afetaram o peso corporal tanto em ratos normais (painéis à esquerda), como em ratos com necrose tubular aguda induzida pela GT (painéis à direita). O peso corporal não foi afetado, de forma significativa pelo tratamento com GT (Fig. 17A e B). Similarmente, o peso dos rins direito e esquerdo não foi afetado pelo tratamento com EB e suas frações FAE e FB (Fig. 18) nem em ratos normais (painéis à esquerda), nem tratados com GT (painéis à direita). No entanto, o peso dos rins foram mais elevados em todos os grupos pré-tratados, por 5 dias, com GT. Por exemplo, no grupo GT Sal, o peso dos rins direito e esquerdo foi de $1,64 \pm 0,10$ e $1,65 \pm 0,02$ g, respectivamente. Estes valores foram maiores do que aqueles observados nos rins do grupo Sal Sal (direito, $0,94 \pm 0,07$ g e esquerdo, $1,14 \pm 0,13$ g).

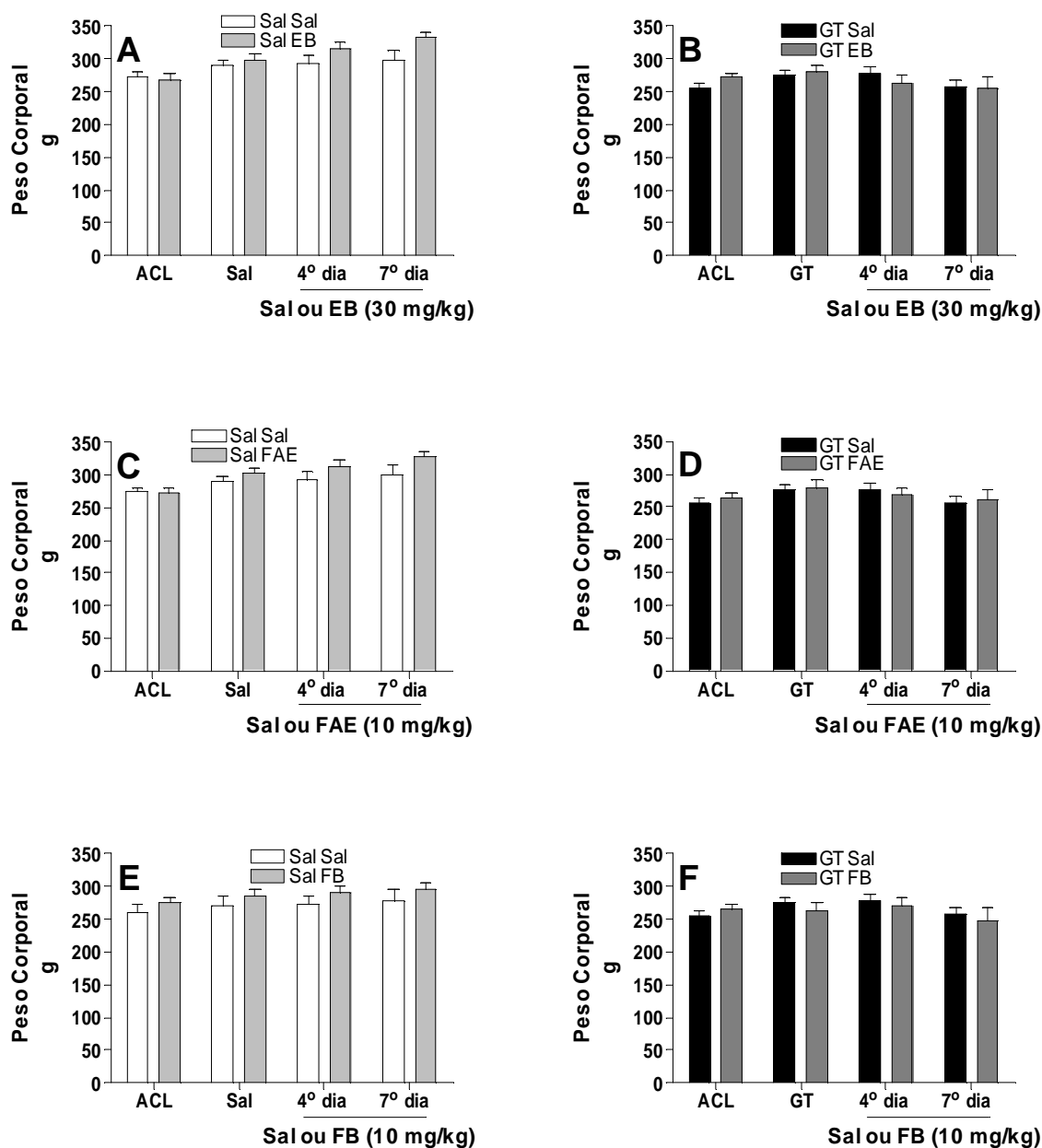


Figura 17. Efeito do EB e suas frações FAE e FB sobre o peso corporal de ratos normais (painéis à esquerda) e ratos após 5 dias de tratamento com gentamicina (GT, painéis à direita). O EB (30 mg/kg) e as frações (10 mg/kg) FAE e FB foram administrados ou não (grupos Sal Sal, n = 6 e GT Sal, n = 6), por gavagem, 1 vez/dia, durante 7 dias. Em **A**, **C** e **E**, efeito do EB (n = 6), FAE (n = 6) e FB (n = 5), respectivamente, após 4 e 7 dias de administração em ratos normais. Em **B**, **D** e **F**, efeito do EB (n = 6), FAE (n = 6) e FB (n = 6), respectivamente, após 4 e 7 dias de administração em ratos tratados com GT. ACL, aclimatação; Sal, NaCl 0,9%. Os valores representam a média \pm EPM.

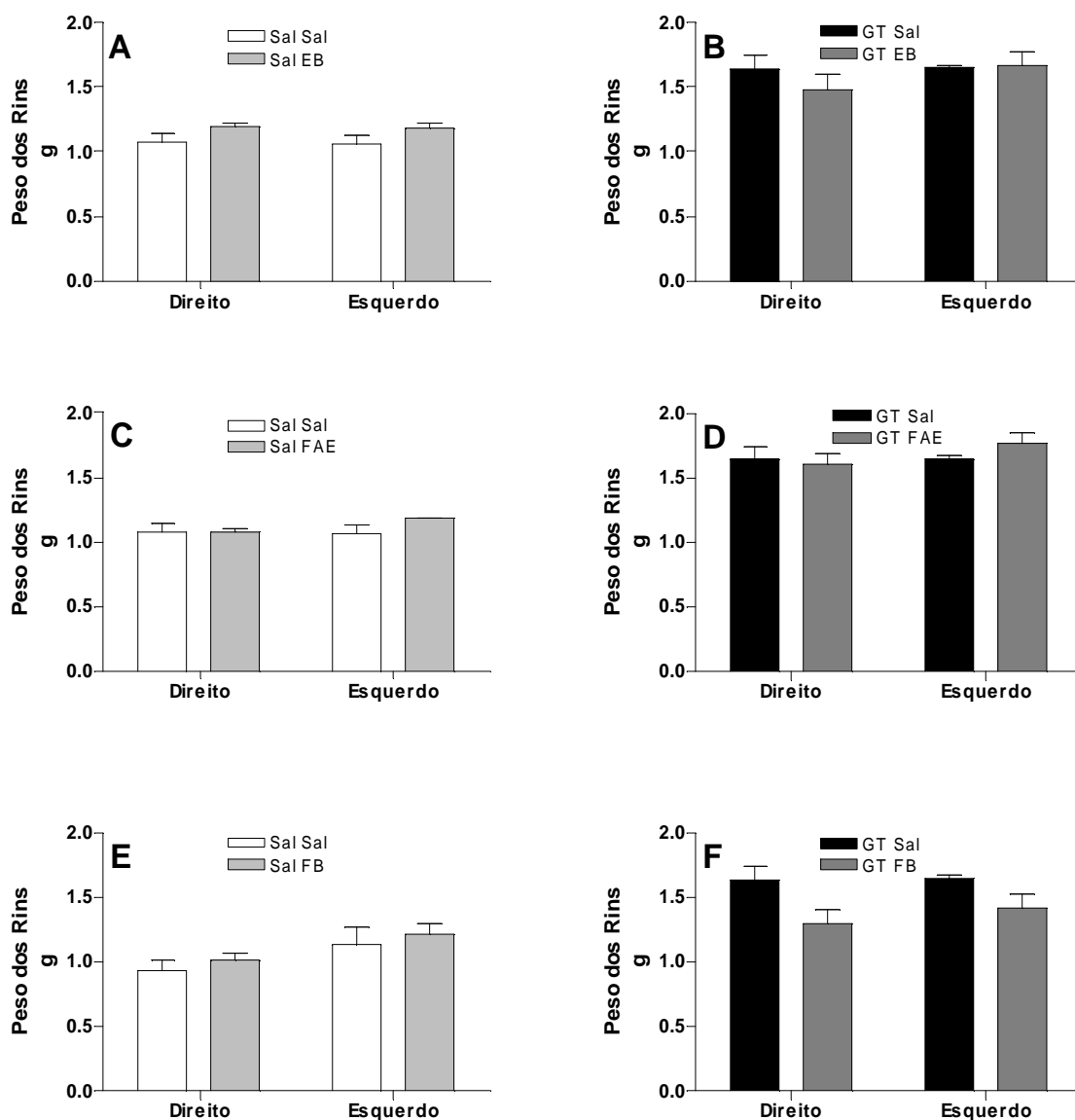


Figura 18. Efeito do EB e suas frações FAE e FB sobre o peso dos rins de ratos normais (painéis à esquerda) e ratos após 5 dias de tratamento com gentamicina (GT, painéis à direita). O EB (30 mg/kg) e as frações (10 mg/kg) FAE e FB foram administrados ou não (grupos Sal Sal, n = 6 e GT Sal, n = 6), por gavagem, 1 vez/dia, durante 7 dias. Em **A**, **C** e **E**, efeito do EB (n = 6), FAE (n = 6) e FB (n = 5), respectivamente, após 4 e 7 dias de administração em ratos normais. Em **B**, **D** e **F**, efeito do EB (n = 6), FAE (n = 6) e FB (n = 6), respectivamente, após 4 e 7 dias de administração em ratos tratados com GT. ACL, aclimatação; Sal, NaCl 0,9%. Os valores representam a média \pm EPM.

4.3.2 Ingestão de água

A Figura 19 mostra que o EB e suas frações FAE e FB não afetaram a ingestão de água em ratos normais (painéis à esquerda). Similarmente, a GT, por 5 dias, não alterou a ingestão de água (painéis à direita), porém, essa ingestão mostrou-se mais elevada no 7º após o término da indução de NTA com GT (grupo GT Sal, $45,0 \pm 2,2$ ml/24h no 7º dia vs $30,7 \pm 3,8$ ml/24h, $p < 0,05$).

4.4 Efeito do extrato bruto das folhas de *E. macrophyllus* e de suas frações FAE e FB sobre a função renal em ratos com necrose tubular

Os dados apresentados, a seguir, foram obtidos através do protocolo II (item 3.3.2), onde foi investigado o efeito do EB e de suas frações FAE e FB sobre parâmetros de função renal em ratos com necrose tubular aguda induzida por gentamicina.

4.4.1 Creatinina plasmática e ritmo de filtração glomerular (clearance de creatinina)

Conforme ilustrado na Figura 20, o EB e suas frações FAE e FB não afetaram a concentração plasmática de creatinina em ratos normais (painéis à esquerda). No entanto, o tratamento com GT, por 5 dias (painéis à direita), aumentou significativamente tal concentração, aumento este, que ainda pôde ser observado 7 dias após o término da indução de NTA com GT (grupo GT Sal). Aumento similar na creatinina plasmática também foi observado no grupo com NTA induzida pela GT e tratado com EB (grupo GT EB) por 4 dias. Porém, o tratamento com EB por 7 dias retornou a creatinina plasmática a valores similares àqueles observados na ACL. As frações FAE e FB, administradas por 7 dias, não apresentaram qualquer efeito sobre o aumento da concentração plasmática de creatinina observada nos ratos pré-tratados com GT (Figs. 20D e 20E). O pré-tratamento com GT produziu queda do clearance de creatinina (Fig. 21, painéis à direita), efeito este, revertido pelo administração de EB por 7 dias (Fig. 21B, grupo

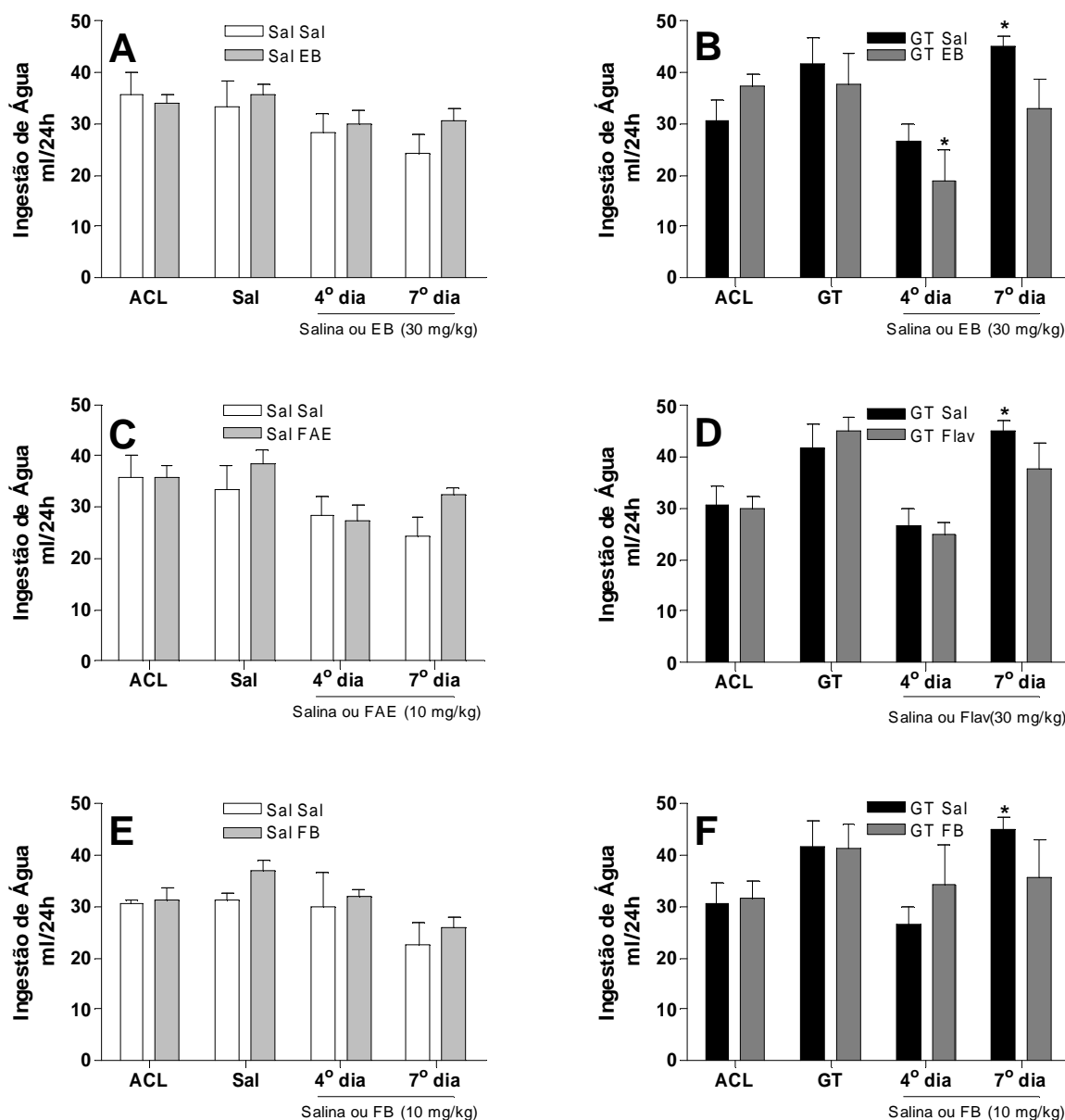


Figura 19. Efeito do EB e suas frações FAE e FB sobre a ingestão de água em ratos normais (painéis à esquerda) e ratos após 5 dias de tratamento com gentamicina (GT, painéis à direita). O EB (30 mg/kg) e as frações (10 mg/kg) FAE e FB foram administrados ou não (grupos Sal Sal, n = 6 e GT Sal, n = 6), por gavagem, 1 vez/dia, durante 7 dias. Em **A**, **C** e **E**, efeito do EB (n = 6), FAE (n = 6) e FB (n = 5), respectivamente, após 4 e 7 dias de administração em ratos normais. Em **B**, **D** e **F**, efeito do EB (n = 6), FAE (n = 6) e FB (n = 6), respectivamente, após 4 e 7 dias de administração em ratos tratados com GT. ACL, aclimatação; Sal, NaCl 0,9%. *p < 0,05 vs ACL no mesmo grupo. Os valores representam a média ± EPM.

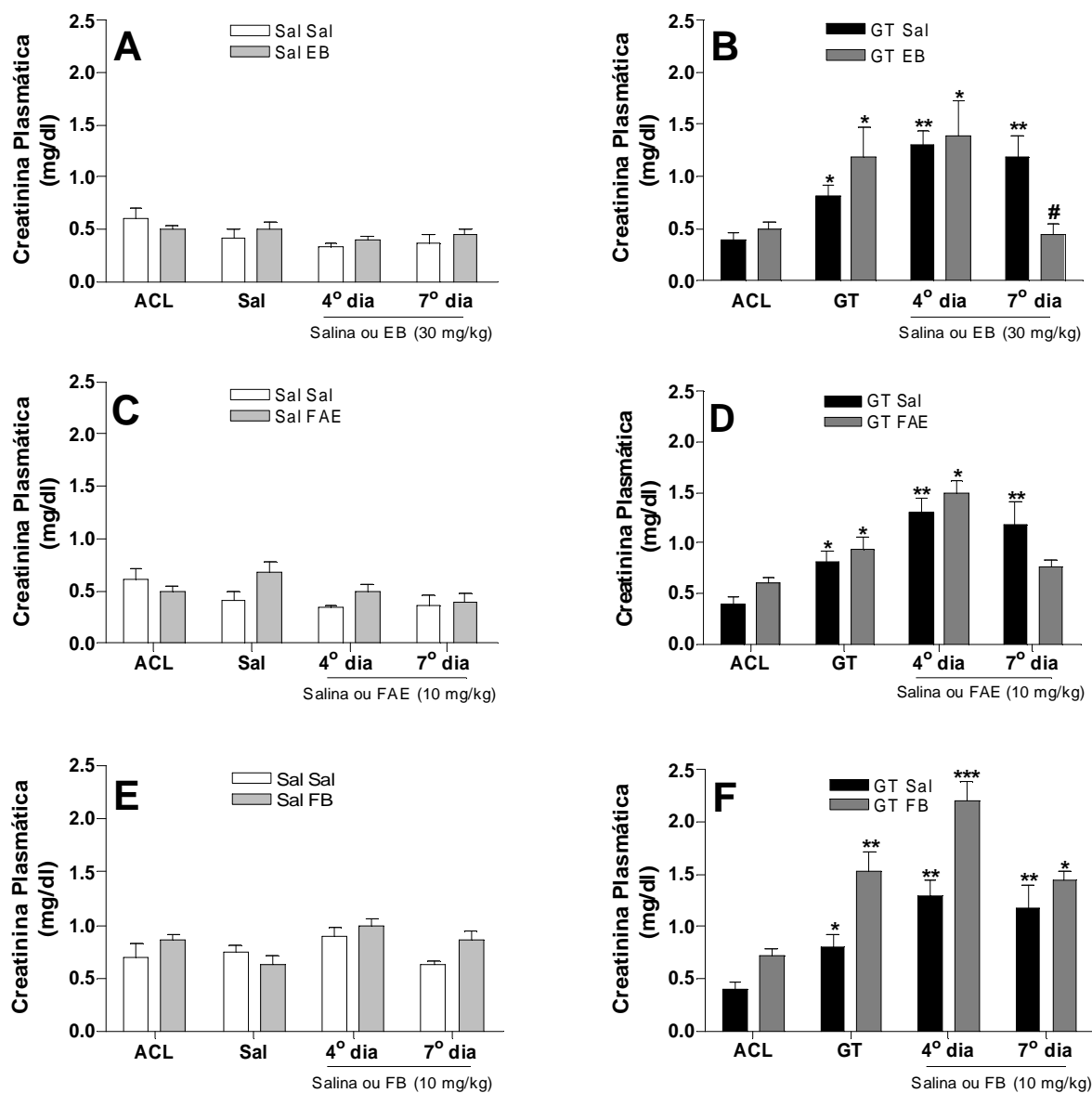


Figura 20. Efeito do EB e suas frações FAE e FB sobre a concentração plasmática de creatinina em ratos normais (painéis à esquerda) e ratos após 5 dias de tratamento com gentamicina (GT, painéis à direita). O EB (30 mg/kg) e as frações (10 mg/kg) FAE e FB foram administrados ou não (grupos Sal Sal, $n = 6$ e GT Sal, $n = 6$), por gavagem, 1 vez/dia, durante 7 dias. Em **A**, **C** e **E**, efeito do EB ($n = 6$), FAE ($n = 6$) e FB ($n = 5$), respectivamente, após 4 e 7 dias de administração em ratos normais. Em **B**, **D** e **F**, efeito do EB ($n = 6$), FAE ($n = 6$) e FB ($n = 6$), respectivamente, após 4 e 7 dias de administração em ratos tratados com GT. ACL, aclimação; Sal, NaCl 0,9%. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs ACL no mesmo grupo; # $p < 0,05$ vs 7º dia do grupo GT Sal. Os valores representam a média \pm EPM.

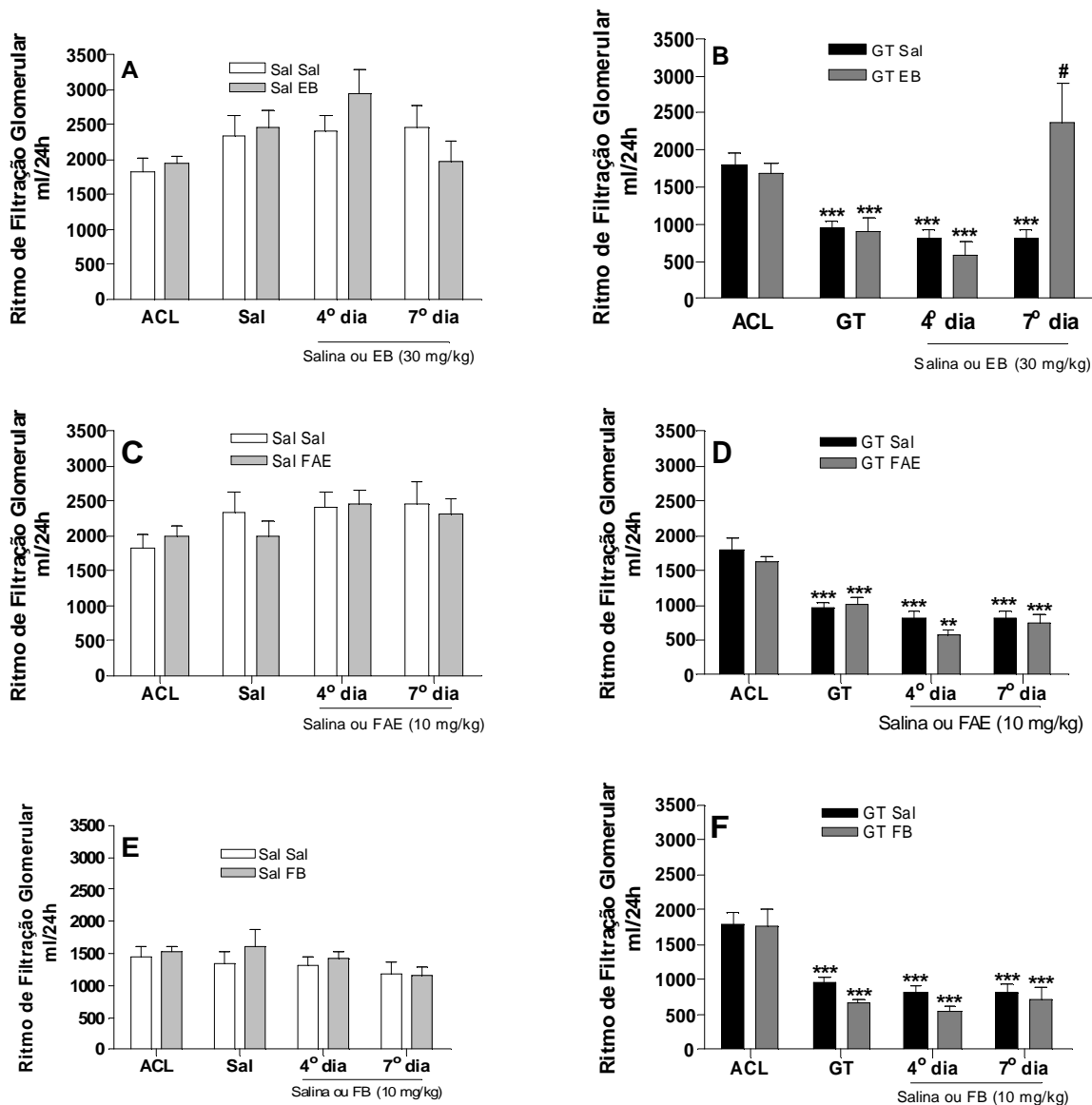


Figura 21. Efeito do EB e suas frações FAE e FB sobre o ritmo de filtração glomerular (clearance de creatinina) em ratos normais (painéis à esquerda) e ratos após 5 dias de tratamento com gentamicina (GT, painéis à direita). O EB (30 mg/kg) e as frações (10 mg/kg) FAE e FB foram administrados ou não (grupos Sal Sal, $n = 6$ e GT Sal, $n = 6$), por gavagem, 1 vez/dia, durante 7 dias. Em **A**, **C** e **E**, efeito do EB ($n = 6$), FAE ($n = 6$) e FB ($n = 5$), respectivamente, após 4 e 7 dias de administração em ratos normais. Em **B**, **D** e **F**, efeito do EB ($n = 6$), FAE ($n = 6$) e FB ($n = 6$), respectivamente, após 4 e 7 dias de administração em ratos tratados com GT. ACL, aclimatação; Sal, NaCl 0,9%. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs ACL no mesmo grupo; # $p < 0,05$ vs 7º dia do grupo GT Sal. Os valores representam a média \pm EPM.

GT EB). As frações FAE e FB não interferiram na redução do clearance de creatinina induzida pela GT (Figs. 21D e 21E).

4.4.2 Uréia plasmática

A Figura 22 mostra que o EB e suas frações FAE e FB não afetaram a concentração plasmática de uréia em ratos normais (painéis à esquerda). No entanto, o tratamento com GT, por 5 dias (painéis à direita), aumentou significativamente tal concentração, aumento este, detectado aos 4 dias após o término da indução de NTA com GT (grupo GT Sal). Mas, no 7º dia após o término da indução, a concentração plasmática de uréia já havia retornado a valores similares àqueles observados antes da indução (período de ACL). O tratamento com EB, FAE ou FB (painéis à direita), por 7 dias, não foi capaz de modificar o perfil da uréia plasmática quando em comparação com os ratos com NTA não tratados com o EB e frações.

4.4.3 Fluxo urinário e fração de excreção de água

Na Figura 23 está mostrado que o EB e suas frações FAE e FB não afetaram o fluxo urinário em ratos normais (painéis à esquerda). O tratamento com GT, por si só, por 5 dias (painéis à direita), elevou a produção de urina, efeito este, observado até o 7º após o término da indução de NTA com GT (grupo GT Sal). O tratamento com EB, FAE ou FB (painéis à direita), por 7 dias, não foi capaz de interferir com o aumento da diurese observada em resposta à GT quando comparado com os ratos com NTA não tratados com o EB e frações (grupo GT Sal).

A fração de excreção de H₂O encontra-se ilustrada na Figura 24. Nos ratos normais (painéis à esquerda), a fração de excreção de H₂O mostrou-se mais elevada em resposta à FB no 7º dia de administração da fração (Fig. 24E). O EB e a fração FAE não produziram qualquer efeito detectável sobre a excreção de água (Figs. 24A e 24C). De forma similar ao observado para o fluxo urinário, a GT, por si só, por 5 dias (painéis à direita), elevou a fração de excreção de água que foi observado até o 7º após o término da indução de NTA com GT (grupo GT Sal). O EB, embora não tenha afetado a diurese induzida pela GT, foi capaz de

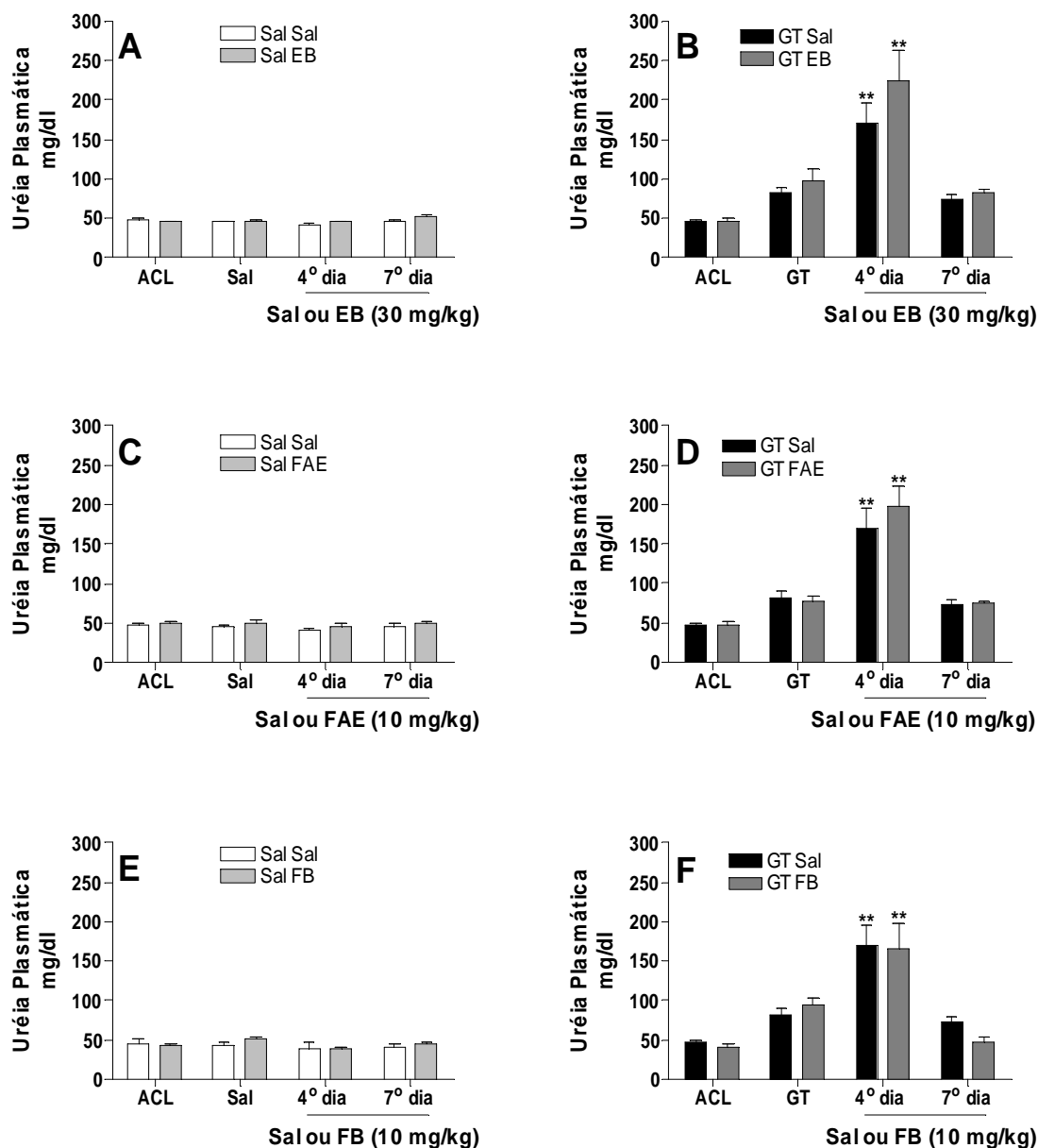


Figura 22. Efeito do EB e suas frações FAE e FB sobre a concentração plasmática de uréia em ratos normais (painéis à esquerda) e ratos após 5 dias de tratamento com gentamicina (GT, painéis à direita). O EB (30 mg/kg) e as frações (10 mg/kg) FAE e FB foram administrados ou não (grupos Sal Sal, $n = 6$ e GT Sal, $n = 6$), por gavagem, 1 vez/dia, durante 7 dias. Em **A**, **C** e **E**, efeito do EB ($n = 6$), FAE ($n = 6$) e FB ($n = 5$), respectivamente, após 4 e 7 dias de administração em ratos normais. Em **B**, **D** e **F**, efeito do EB ($n = 6$), FAE ($n = 6$) e FB ($n = 6$), respectivamente, após 4 e 7 dias de administração em ratos tratados com GT. ACL, aclimação; Sal, NaCl 0,9%. ** $p < 0,01$ vs ACL no mesmo grupo. Os valores representam a média \pm EPM.

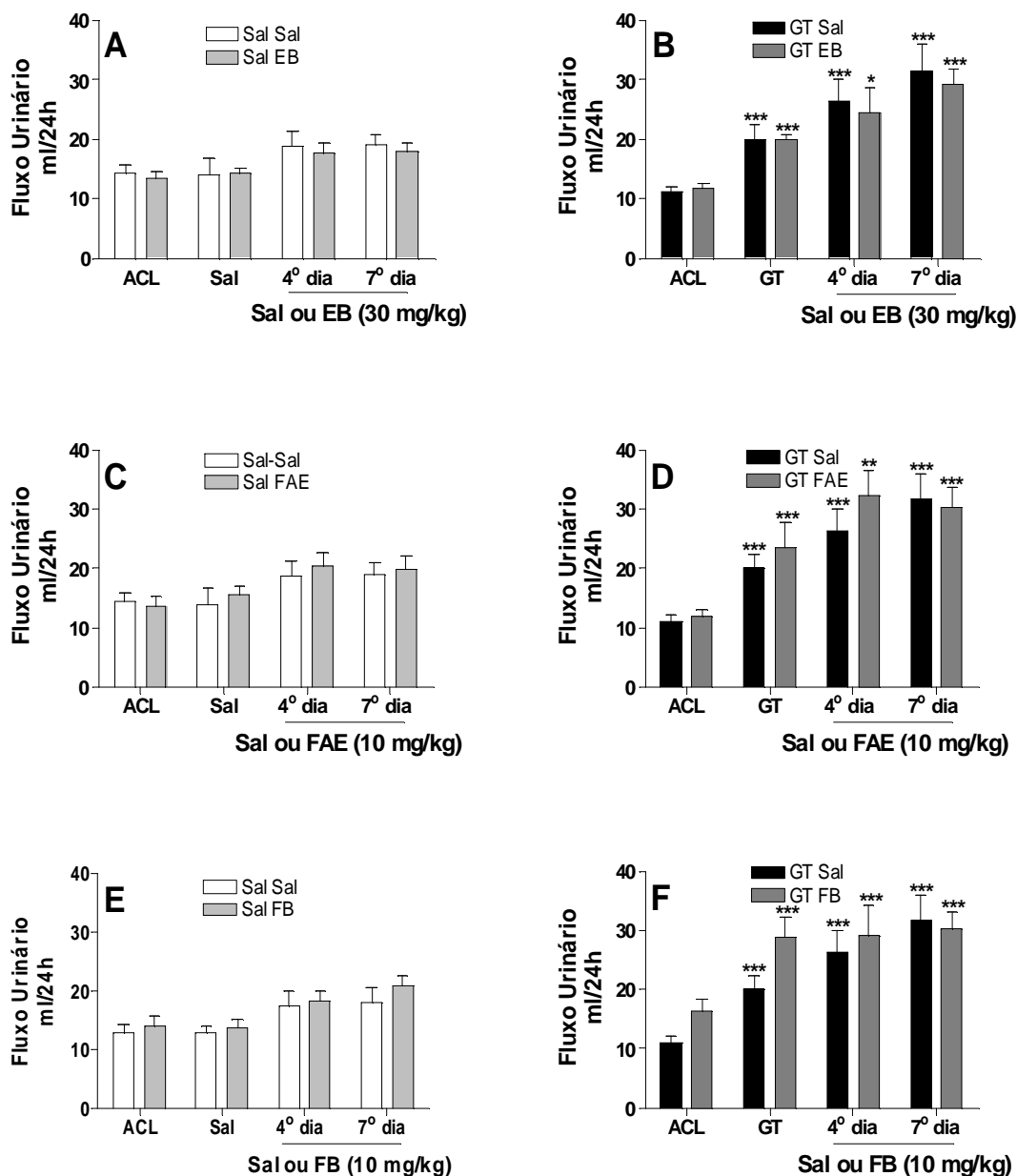


Figura 23. Efeito do EB e suas frações FAE e FB sobre o fluxo urinário em ratos normais (painéis à esquerda) e ratos após 5 dias de tratamento com gentamicina (GT, painéis à direita). O EB (30 mg/kg) e as frações (10 mg/kg) FAE e FB foram administrados ou não (grupos Sal Sal, $n = 6$ e GT Sal, $n = 6$), por gavagem, 1 vez/dia, durante 7 dias. Em **A**, **C** e **E**, efeito do EB ($n = 6$), FAE ($n = 6$) e FB ($n = 5$), respectivamente, após 4 e 7 dias de administração em ratos normais. Em **B**, **D** e **F**, efeito do EB ($n = 6$), FAE ($n = 6$) e FB ($n = 6$), respectivamente, após 4 e 7 dias de administração em ratos tratados com GT. ACL, aclimatação; Sal, NaCl 0,9%. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs ACL no mesmo grupo. Os valores representam a média \pm EPM.

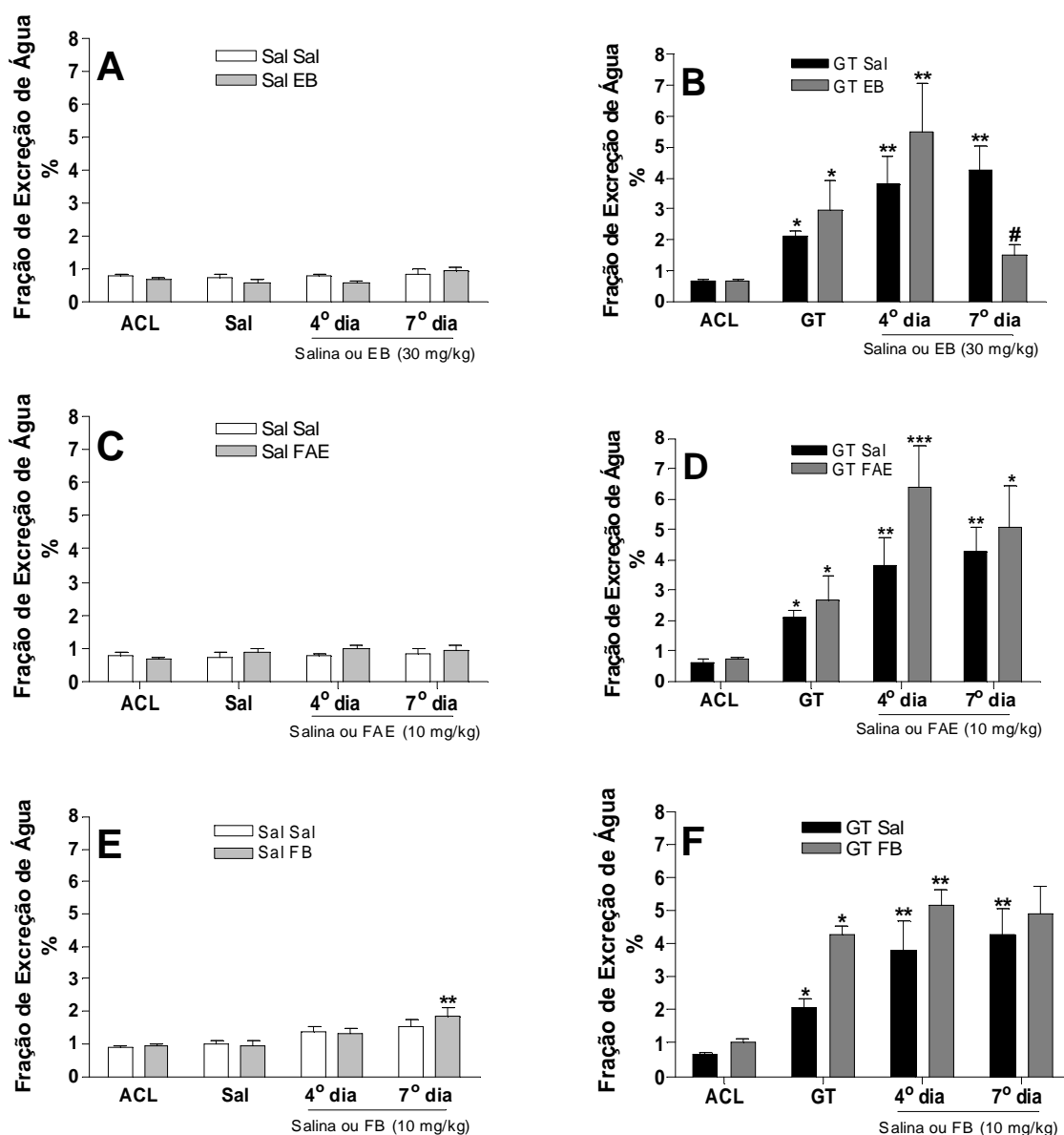


Figura 24. Efeito do EB e suas frações FAE e FB sobre a fração de excreção de água em ratos normais (painéis à esquerda) e ratos após 5 dias de tratamento com gentamicina (GT, painéis à direita). O EB (30 mg/kg) e as frações (10 mg/kg) FAE e FB foram administrados ou não (grupos Sal Sal, n = 6 e GT Sal, n = 6), por gavagem, 1 vez/dia, durante 7 dias. Em **A**, **C** e **E**, efeito do EB (n = 6), FAE (n = 6) e FB (n = 5), respectivamente, após 4 e 7 dias de administração em ratos normais. Em **B**, **D** e **F**, efeito do EB (n = 6), FAE (n = 6) e FB (n = 6), respectivamente, após 4 e 7 dias de administração em ratos tratados com GT. ACL, aclimação; Sal, NaCl 0,9%. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 vs ACL no mesmo grupo. #p<0,05 vs 7º dia do grupo GT Sal. Os valores representam a média ± EPM.

reverter a queda do clearance de creatinina induzida pela mesma, o que refletiu em redução da fração de excreção de H₂O (Fig. 24B). Já o tratamento com FAE ou FB (Figs. 24D e 24F), por 7 dias, não foi capaz de interferir com o aumento da fração de excreção de H₂O observada em resposta à GT quando comparado com os ratos com NTA não tratados com as frações (grupo GT Sal).

4.4.4 Proteinúria

O EB e suas frações FAE e FB não afetaram a excreção urinária de proteína em ratos normais (Fig. 25, painéis à esquerda). O tratamento com GT, por si só, por 5 dias (painéis à direita), elevou a excreção de proteína, elevação esta, observada até o 7^o após o término da indução de NTA com GT (grupo GT Sal). O tratamento com EB e FAE (painéis à direita), por 7 dias, não foi capaz de interferir com o aumento da proteinúria induzida pela GT quando comparado com os ratos com NTA não tratados com o EB e frações (grupo GT Sal). No entanto, a proteinúria produzida pela GT foi revertida pelo tratamento com a FB por 4 dias (Fig. 25F).

Pela Figura 26 pode-se observar que o EB e suas frações FAE e FB não afetaram a razão proteinúria/creatinina urinária (relação UP:C) em ratos normais (painéis à esquerda). Após tratamento somente com GT, por 5 dias (painéis à direita), houve elevação da relação UP:C, a qual permanecia elevada até o 7^o após o término da indução de NTA com GT (grupo GT Sal). O tratamento com EB e FAE (painéis à direita), por 7 dias, não foi capaz de interferir com o aumento da relação UP:C em resposta à GT quando comparado aos ratos com NTA não tratados com o EB e frações (grupo GT Sal). No entanto, o aumento da relação UP:C produzida pela GT foi revertida pelo tratamento com a FB por 4 dias (Fig. 26F).

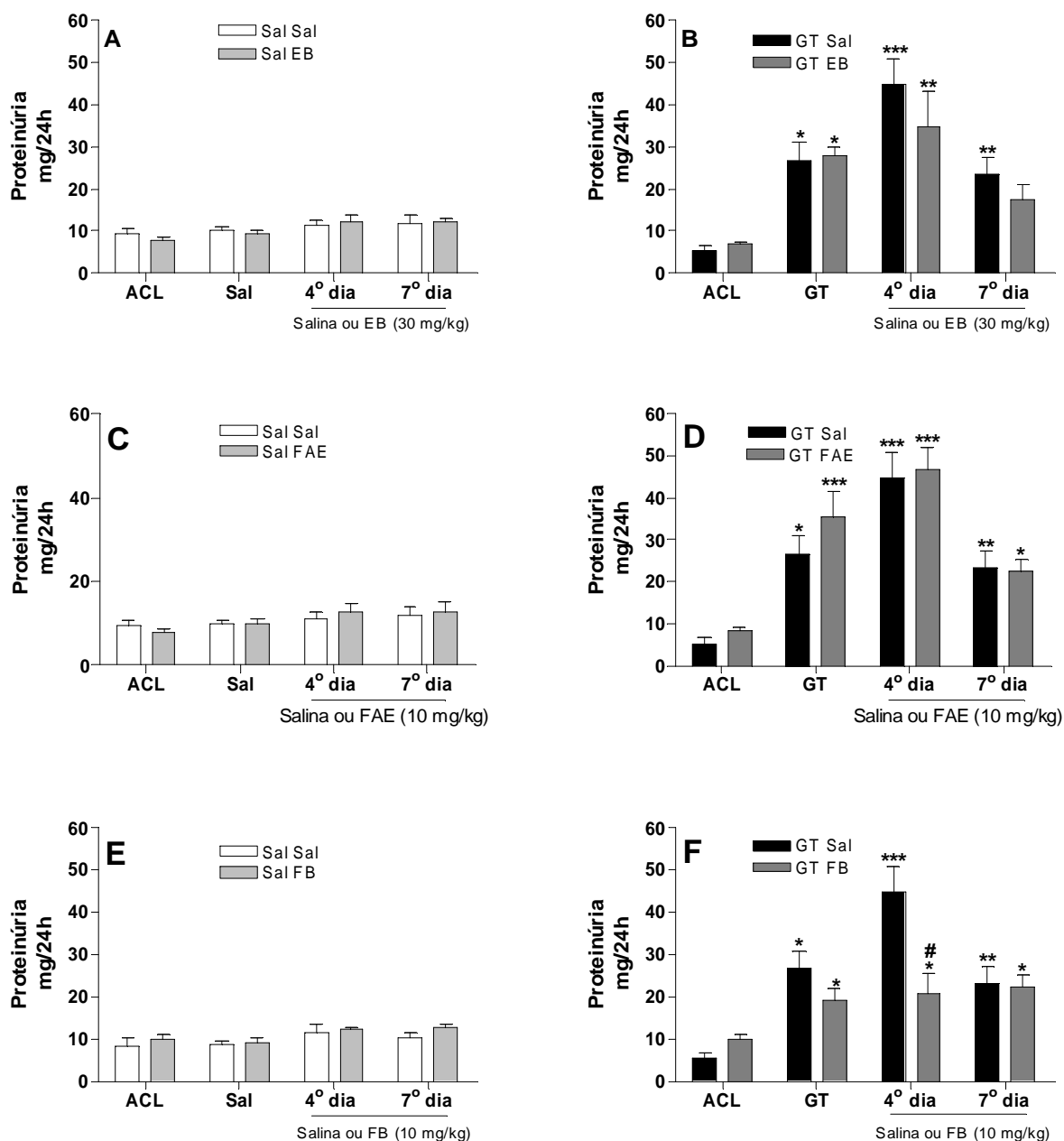


Figura 25. Efeito do EB e suas frações FAE e FB sobre excreção urinária de proteína em ratos normais (painéis à esquerda) e ratos após 5 dias de tratamento com gentamicina (GT, painéis à direita). O EB (30 mg/kg) e as frações (10 mg/kg) FAE e FB foram administrados ou não (grupos Sal Sal, n = 6 e GT Sal, n = 6), por gavagem, 1 vez/dia, durante 7 dias. Em **A**, **C** e **E**, efeito do EB (n = 6), FAE (n = 6) e FB (n = 5), respectivamente, após 4 e 7 dias de administração em ratos normais. Em **B**, **D** e **F**, efeito do EB (n = 6), FAE (n = 6) e FB (n = 6), respectivamente, após 4 e 7 dias de administração em ratos tratados com GT. ACL, aclimação; Sal, NaCl 0,9%. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 vs ACL no mesmo grupo. #p<0,05 vs 4º dia do grupo GT Sal. Os valores representam a média ± EPM.

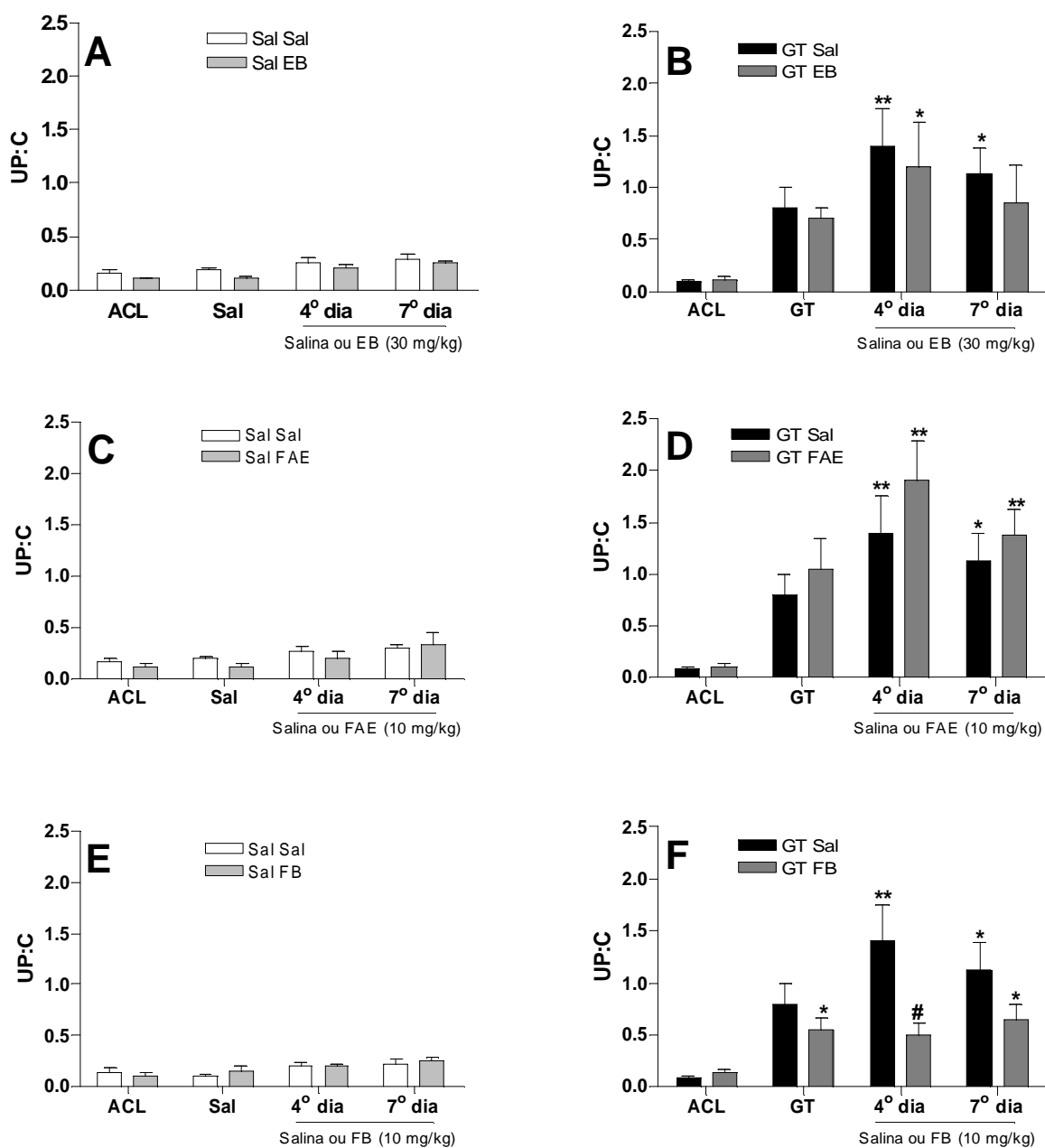


Figura 26. Efeito do EB e suas frações FAE e FB sobre a relação UP:C em ratos normais (painéis à esquerda) e ratos após 5 dias de tratamento com gentamicina (GT, painéis à direita). O EB (30 mg/kg) e as frações (10 mg/kg) FAE e FB foram administrados ou não (grupos Sal Sal, $n = 6$ e GT Sal, $n = 6$), por gavagem, 1 vez/dia, durante 7 dias. Em **A**, **C** e **E**, efeito do EB ($n = 6$), FAE ($n = 6$) e FB ($n = 5$), respectivamente, após 4 e 7 dias de administração em ratos normais. Em **B**, **D** e **F**, efeito do EB ($n = 6$), FAE ($n = 6$) e FB ($n = 6$), respectivamente, após 4 e 7 dias de administração em ratos tratados com GT. ACL, aclimação; Sal, NaCl 0,9%. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ vs ACL no mesmo grupo. # $p < 0,05$ vs 4º dia do grupo GT Sal. Os valores representam a média \pm EPM.

4.4.5 Sódio, potássio e água Livre

A fração de excreção de sódio encontra-se ilustrada na Figura 27. Nos ratos normais (painéis à esquerda), a excreção de sódio mostrou-se mais elevada em resposta ao EB e à FB quando em comparação com os respectivos períodos de aclimação (ACL) (Figs. 27A e 27C). Já a fração FAE não produziu qualquer efeito detectável sobre a excreção de sódio (Fig. 27B), em ratos normais. O aumento da excreção desse eletrólito, observado aos 4 e 7 dias de tratamento com a FB, também foi significativamente maior quando comparado com o grupo Sal Sal nos mesmos dias. A GT, por si só, por 5 dias (painéis à direita) elevou, de forma mais acentuada, a excreção urinária de sódio, efeito este, observado até o 7º dia após o término da indução de NTA com GT (grupo GT Sal). Enquanto que o EB foi capaz de reverter o aumento da fração de excreção de sódio no 7º dia de administração do mesmo (Fig. 27B), as frações FAE e FB apresentaram um efeito contrário, observado já no 4º dia de administração, ou seja, essas frações acentuaram o aumento da excreção de sódio induzido pela GT (Figs. 27D e 27E).

A excreção de potássio (Fig. 28) mostrou-se mais elevada em resposta à FB nos ratos normais quando em comparação com o período de aclimação (ACL) (Fig. 28C). O EB e a fração FAE não produziram qualquer efeito detectável sobre a excreção de potássio (Figs. 28A e 28B), em ratos normais. A GT, por si só, por 5 dias (painéis à direita) aumentou a excreção urinária de potássio (Fig. 28B). O EB foi capaz de reverter a fração de excreção elevada desse eletrólito no 7º dia de administração do mesmo (Fig. 28B). A fração FAE não apresentou efeito significativo sobre a eliminação do potássio (Fig. 28D) ao passo que o resultado com a FB não foi conclusivo (Fig. 28E).

Tanto o EB, quanto a fração FB, aumentaram o *clearance* osmolar em ratos normais (painéis à esquerda), quando em comparação com os respectivos períodos de aclimação (ACL) (Figs. 29A e 29C). Já a fração FAE não produziu qualquer efeito detectável sobre esse parâmetro (Fig. 29B), em ratos normais. Também, o aumento do mesmo, observado no 4º dia de tratamento com a FB, foi significativamente maior quando comparado com o grupo Sal Sal no mesmo dia (Fig. 29C).

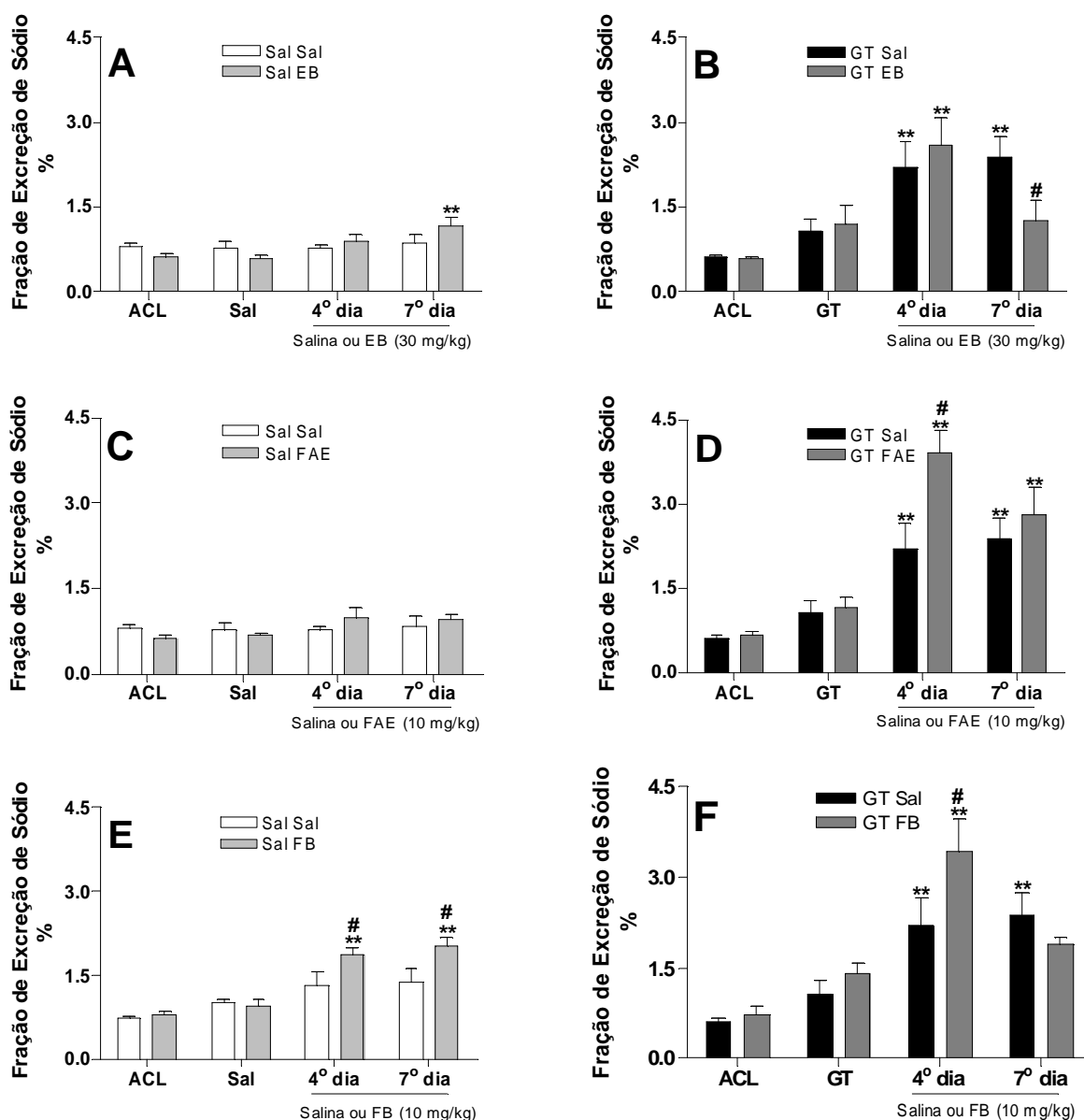


Figura 27. Efeito do EB e suas frações FAE e FB sobre a fração de excreção de sódio em ratos normais (painéis à esquerda) e ratos após 5 dias de tratamento com gentamicina (GT, painéis à direita). O EB (30 mg/kg) e as frações (10 mg/kg) FAE e FB foram administrados ou não (grupos Sal Sal, $n = 6$ e GT Sal, $n = 6$), por gavagem, 1 vez/dia, durante 7 dias. Em **A**, **C** e **E**, efeito do EB ($n = 6$), FAE ($n = 6$) e FB ($n = 5$), respectivamente, após 4 e 7 dias de administração em ratos normais. Em **B**, **D** e **F**, efeito do EB ($n = 6$), FAE ($n = 6$) e FB ($n = 6$), respectivamente, após 4 e 7 dias de administração em ratos tratados com GT. ACL, aclimação; Sal, NaCl 0,9%. ** $p < 0,01$ vs ACL no mesmo grupo. # $p < 0,05$ vs 4º ou 7º dia do grupo GT Sal. Os valores representam a média \pm EPM.

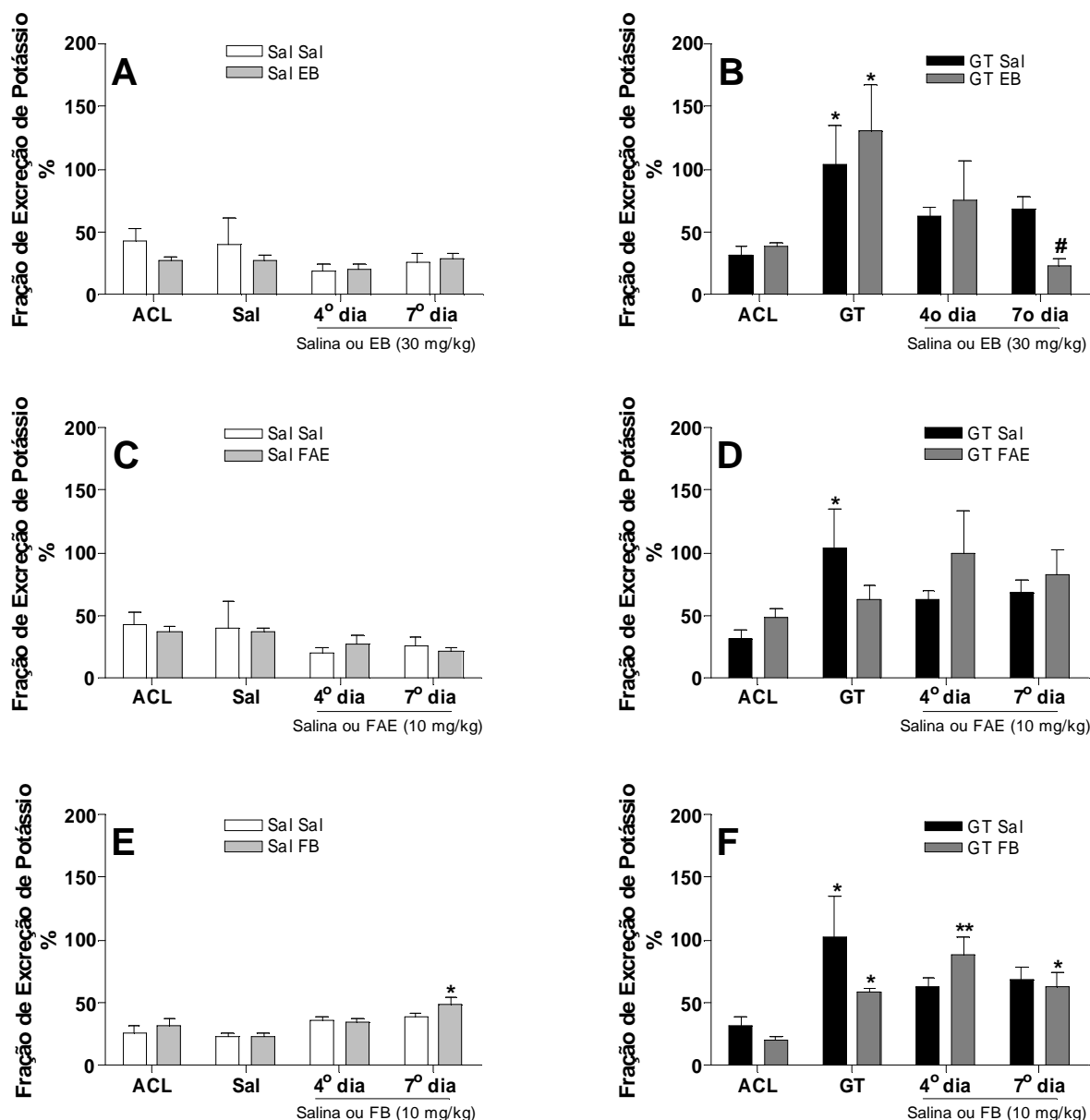


Figura 28. Efeito do EB e suas frações FAE e FB sobre a fração de excreção de potássio em ratos normais (painéis à esquerda) e ratos após 5 dias de tratamento com gentamicina (GT, painéis à direita). O EB (30 mg/kg) e as frações (10 mg/kg) FAE e FB foram administrados ou não (grupos Sal Sal, $n = 6$ e GT Sal, $n = 6$), por gavagem, 1 vez/dia, durante 7 dias. Em **A**, **C** e **E**, efeito do EB ($n = 6$), FAE ($n = 6$) e FB ($n = 5$), respectivamente, após 4 e 7 dias de administração em ratos normais. Em **B**, **D** e **F**, efeito do EB ($n = 6$), FAE ($n = 6$) e FB ($n = 6$), respectivamente, após 4 e 7 dias de administração em ratos tratados com GT. ACL, aclimação; Sal, NaCl 0,9%. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ vs ACL no mesmo grupo. # $p < 0,05$ vs 7º dia do grupo GT Sal. Os valores representam a média \pm EPM.

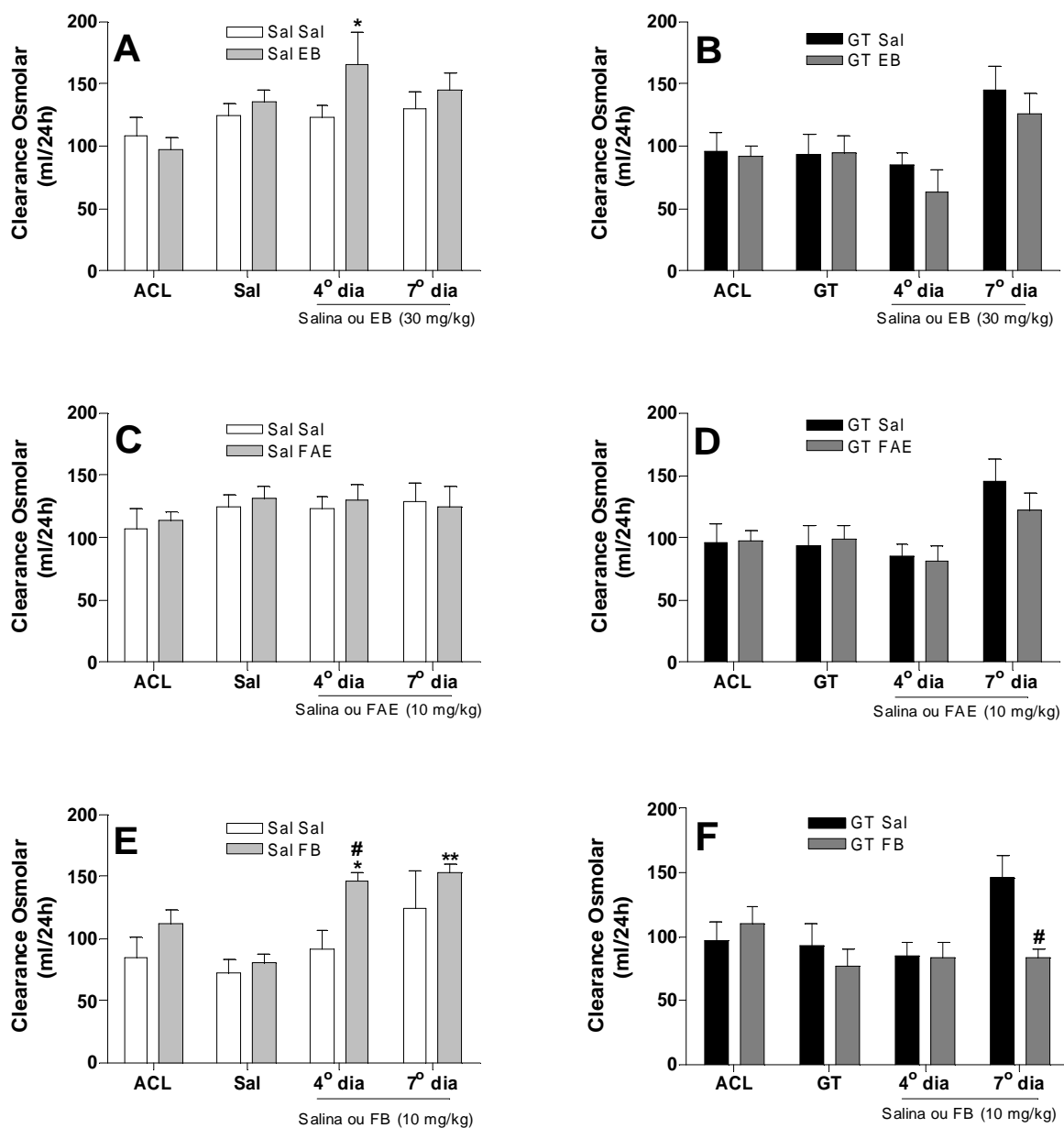


Figura 29. Efeito do EB e suas frações FAE e FB sobre o *clearance* osmolar em ratos normais (painéis à esquerda) e ratos após 5 dias de tratamento com gentamicina (GT, painéis à direita). O EB (30 mg/kg) e as frações (10 mg/kg) FAE e FB foram administrados ou não (grupos Sal Sal, n = 6 e GT Sal, n = 6), por gavagem, 1 vez/dia, durante 7 dias. Em **A**, **C** e **E**, efeito do EB (n = 6), FAE (n = 6) e FB (n = 5), respectivamente, após 4 e 7 dias de administração em ratos normais. Em **B**, **D** e **F**, efeito do EB (n = 6), FAE (n = 6) e FB (n = 6), respectivamente, após 4 e 7 dias de administração em ratos tratados com GT. ACL, aclimação; Sal, NaCl 0,9%. *p<0,05 e **p<0,01 vs ACL no mesmo grupo. #p<0,05 vs 4º ou 7º dia do grupo GT Sal. Os valores representam a média ± EPM.

A GT, por si só, por 5 dias não afetou, de forma significativa, o *clearance* osmolar (Fig. 29, painéis à direita) e esta observação não foi alterada pelo tratamento com EB ou com as frações FAE e FB por 7 dias após o término da indução de NTA com GT (grupo GT Sal).

Os resultados de *clearance* de água livre estão mostrados na Figura 30. Somente a fração FB produziu uma diminuição do *clearance* de água livre em ratos normais (painéis à esquerda), quando em comparação com o respectivo período de aclimação (ACL) (Fig. 30C). Já o EB e a fração FAE não produziu qualquer efeito detectável sobre esse parâmetro (Figs. 30A e 30B), em ratos normais. A GT, por si só, por 5 dias (painéis à direita) não afetou o *clearance* de água livre (Fig. 30, painéis à direita) e esta observação não foi alterada pelo tratamento com EB ou com a fração FAE por 7 dias após o término da indução de NTA com GT (grupo GT Sal). Já o resultado obtido com a FB não foi conclusivo (Fig. 30E).

4.5 Efeito do extrato bruto das folhas de *E. macrophyllus* e de suas frações FAE e FB sobre a morfologia renal em ratos com necrose tubular

A análise histopatológica do rim direito dos ratos dos grupos Sal EB, Sal FAE e Sal FB mostrou aspecto morfológico normal, com preservação da arquitetura do parênquima renal, tal como observado nos animais do grupo Sal Sal e Sal EB (Figs. 31A e 31B). Nos animais do grupo GT-Sal foi observada nefrite intersticial crônica e necrose tubular focais, caracterizadas por infiltrado inflamatório de células mononucleares, junto aos túbulos proximais, cujo epitélio mostrou-se esporadicamente vacuolizado e/ou acidófilo com contração nuclear (Fig. 31C). O mesmo aspecto histopatológico foi observado com a mesma intensidade nos animais do grupo GT-EB (Fig. 31D) e dos grupos GT FAE e GT FB (microfotografias não mostradas).

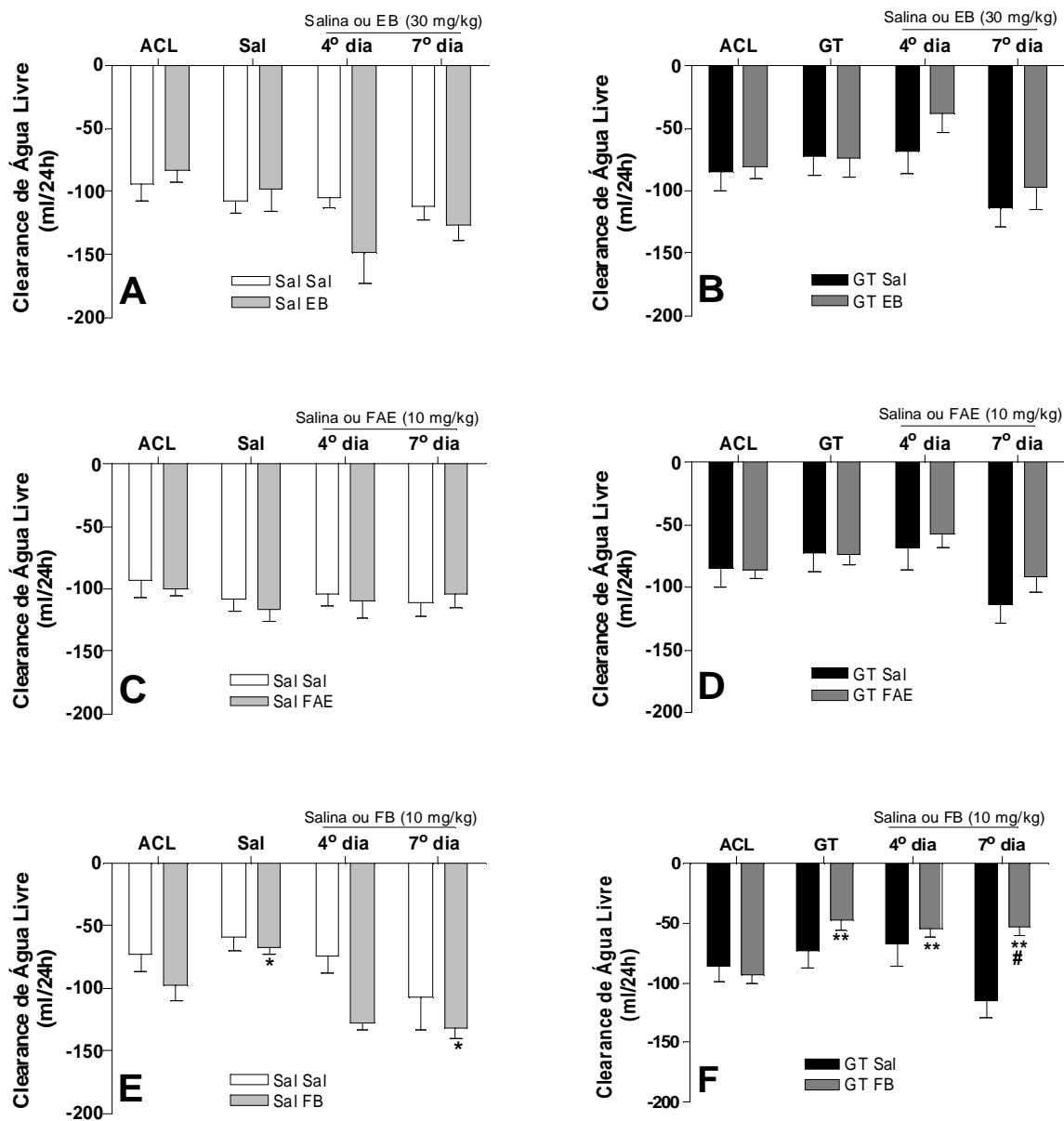


Figura 30. Efeito do EB e suas frações FAE e FB sobre o *clearance* de água livre em ratos normais (painéis à esquerda) e ratos após 5 dias de tratamento com gentamicina (GT, painéis à direita). O EB (30 mg/kg) e as frações (10 mg/kg) FAE e FB foram administrados ou não (grupos Sal Sal, n = 6 e GT Sal, n = 6), por gavagem, 1 vez/dia, durante 7 dias. Em **A**, **C** e **E**, efeito do EB (n = 6), FAE (n = 6) e FB (n = 5), respectivamente, após 4 e 7 dias de administração em ratos normais. Em **B**, **D** e **F**, efeito do EB (n = 6), FAE (n = 6) e FB (n = 6), respectivamente, após 4 e 7 dias de administração em ratos tratados com GT. ACL, aclimação; Sal, NaCl 0,9%. *p<0,05 e **p<0,01 vs ACL no mesmo grupo. #p<0,05 vs 7º dia do grupo GT Sal. Os valores representam a média ± EPM.

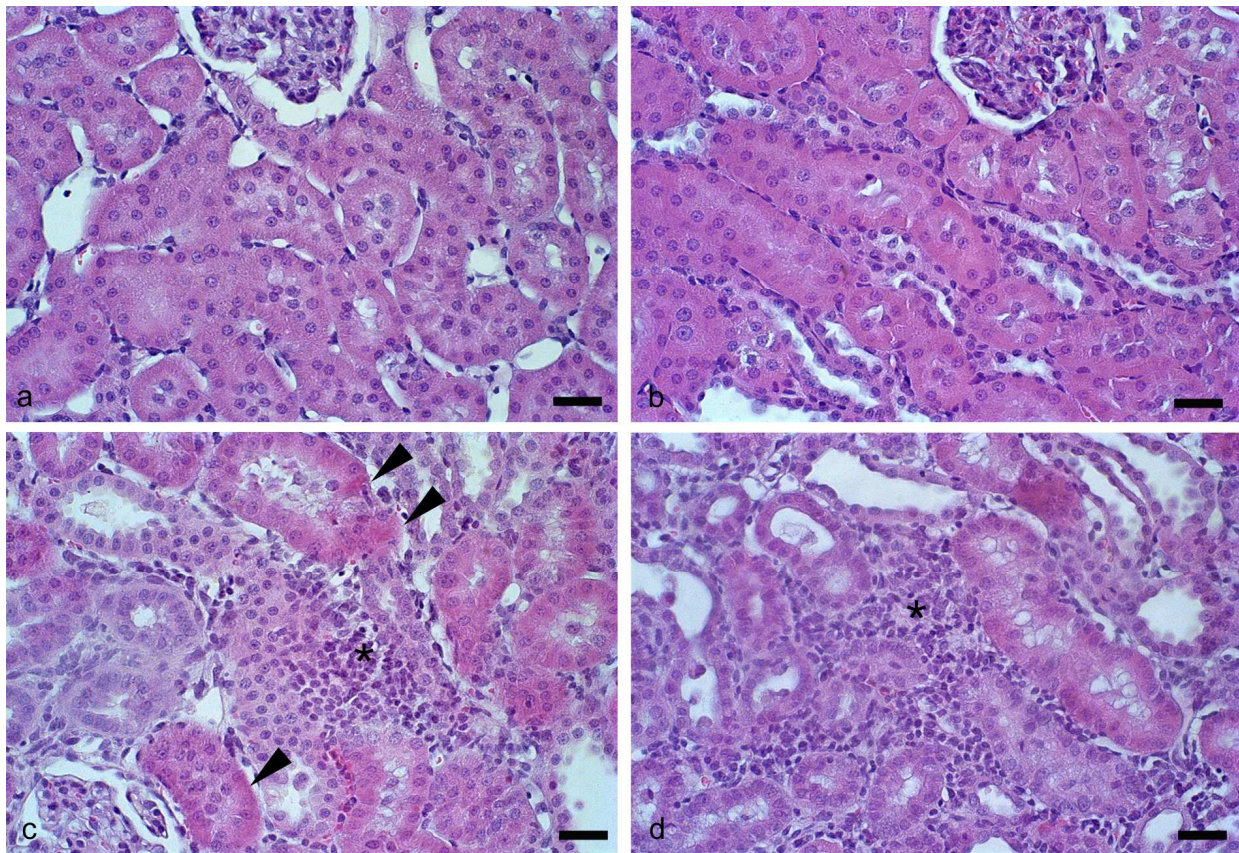


Figura 31. Efeito do EB sobre o aspecto morfológico renal em ratos normais (painéis superiores) e em ratos com NTA induzida com gentamicina (painéis inferiores). Tanto os ratos normais, como aqueles com NTA, foram tratados com EB (30 mg/kg), por gavagem, 1 vez/dia, durante 7 dias. Ao final desse tratamento os ratos foram sacrificados e os rins direito foram removidos. **a** (Sal Sal) e **b** (Sal EB) mostram parênquima renal preservado e sem quaisquer lesões; **c** (GT Sal) e **d** (GT EB), nefrite intersticial crônica e necrose tubular focais no parênquima renal. Nota-se a presença de células tubulares proximais acidófilas, vacuolizadas e com contração nuclear (**cabeças de seta**); infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear (*). Hematoxilina & Eosina. Barra, 20 μ m.

5 DISCUSSÃO

5.1 Controle de qualidade das folhas de *E. macrophyllus*, obtenção do extrato bruto e frações

O controle de qualidade é essencial por que comprova a identidade e qualidade da espécie estudada. . A análise das estruturas microscópicas é importante, pois, tais estruturas são características de cada espécie vegetal.

A principal estrutura encontrada no pó das folhas de *E. macrophyllus* são os pelos tectores, as mesmas descritas por Leite *et al.* (2007) e consta na monografia desta espécie na Farmacopéia Brasileira, 1ª edição (1926). Estruturas semelhantes são encontradas na espécie *E. grandiflorus*, que é outra espécie de chapéu de couro bastante utilizada na medicina tradicional.

O percentual de umidade mostra a proporção de água na amostra vegetal e para cada parte da planta é preconizado um percentual de umidade. Este ensaio é importante, pois o teor elevado de umidade favorece a ação de enzimas, podendo causar degradação dos princípios ativos da espécie vegetal e também favorecer o crescimento microbiológico. A principal causa de teor elevado de umidade é o processo inadequado de secagem ou armazenamento do material vegetal (Simões *et al.*, 1998).

O teor médio de umidade encontrado no pó das folhas de *E. macrophyllus* foi de 11,43%. Este resultado esta de acordo com o teor de umidade para pó de folhas de plantas medicinais, visto que o teor preconizado para drogas vegetais é de 8 a 14% (Simões *et al.*, 1998; F. BRAS. IV, 1998).

O processo utilizado para produção do extrato bruto foi a percolação, onde foi obtido um rendimento de 23% (p/p). A percolação foi o método de escolha que, por ser uma extração com renovação de solvente, consegue extrair quase a totalidade dos constituintes ativos solúveis no solvente. Cabe ressaltar que a padronização do processo extrativo é importante para se obter reprodutibilidade nos ensaios biológicos.

O rendimento das frações isoladas do extrato bruto no processo por nós utilizado foi: fração hexânica (33,91%), FAE (2,78%), FB (7,88%) e FAq (47,46%). Os maiores rendimentos obtidos foram das frações hexânica FAq, mostrando que a planta possui grande quantidade de componentes apolares como clorofila e

óleos essenciais e também compostos polares. Esses dados estão de acordo com estudos em que óleos essenciais (Pimenta *et al.*, 2006) e diversos componentes fenólicos polares (Shnitzler *et al.*, 2007) foram identificados e quantificados nas folhas da espécie *E. grandiflorus*.

5.2 Identificação de compostos no extrato bruto e nas frações semipurificadas

A escolha do marcador químico é essencial para o controle de qualidade da amostra. Os flavonóides foram escolhidos como marcador químico por serem de fácil identificação, por possuírem uma possível ação nefroprotetora e por já serem estudados na espécie *E. grandiflorus*. No extrato etanólico das folhas dessa espécie, a isovitexina é o flavonóide predominante (Pimenta, 2002), embora glicoflavonóides também já tenham sido identificados e quantificados (Shnitzler *et al.*, 2007).

As técnicas de separação e identificação (CCD e CLAE), utilizadas neste estudo, permitiram a identificação de flavonóides no EB, FAE e FB.

Para uma identificação mais precisa dos flavonóides encontrados na *E. macrophyllus* foi utilizada a técnica de CLAE, a qual permite tanto a identificação, quanto a quantificação de princípios ativos vegetais. As condições cromatográficas utilizadas neste estudo foi adaptada de Shnitzler *et al.* (2007). Os parâmetros modificados foram: tamanho de coluna, fluxo e volume de injeção. É comum a adaptação de alguns parâmetros pois, cada cromatógrafo funciona de forma diferente sob uma mesma condição cromatográfica e algumas alterações, no método, são feitas de acordo com a disponibilidade de suprimentos já disponíveis no laboratório de análise.

Os padrões utilizados e identificados pelo sistema cromatográfico utilizado, foram a isovitexina, já identificada na *E. grandiflorus* (Pimenta, 2002; Shnitzler *et al.*, 2007), vitexina e orientina. Nenhum trabalho a respeito da composição de flavonóides na espécie *E. macrophyllus* foi encontrado na literatura.

O perfil de eluição do EB de *E. macrophyllus* mostrou um pico com tempo de retenção (18,36 min) similar ao tempo de retenção dos flavonóides padrão vitexina (18,30 min) e isovitexina (18,94 min). Pode-se acreditar que o pico seja da isovitexina, pois o perfil cromatográfico da FAE, que é uma fração enriquecida em flavonóides, mostra um pico de maior intensidade que parece corresponder à

isovitexina, com tempo de retenção de 18,66 min. Isto mostra que as folhas das espécies *E. macrophyllus* e *E. grandiflorus* possuem composição semelhante quanto ao flavonóide isovitexina que também já foi descrita nesta última (Pimenta, (2002; Shnitzler *et al.*, 2007). Embora não investigados em nosso estudo, outros flavonóides como a glicosilflavona e a swertiajaponina, já identificados na *E. grandiflorus* (Shnitzler *et al.*, 2007) também podem estar presentes nas folhas da espécie *E. macrophyllus*.

De forma similar à FAE, o perfil cromatográfico da FB, apresentou picos com tempos de retenção similares aos dos flavonóides padrão. Pelo perfil da FAE, estes flavonóides parecem estar em maior concentração já que a amplitude dos picos foi maior do que na fração FB.

O perfil cromatográfico da Faq confirma a eficiência do processo de extração, uma vez que nenhum pico correspondente aos flavonóides padrão foi identificado. Isto mostra que os flavonóides foram extraídos principalmente pelo acetato de etila e, depois, pelo n-Butanol. Os picos presentes na Faq são compostos de alta polaridade como polifenóis e açúcares, que são compostos altamente solúveis em água que, por sua vez, foi o solvente com o qual a FAq foi eluída.

É do nosso conhecimento que estudos adicionais são imprescindíveis para um maior detalhamento da composição dos flavonóides encontrados nas folhas da espécie *E. macrophyllus*. E, para isso, será necessário a utilização de outros padrões como swetisin, isoorientina-7,3-dimetil éster, isoorientina e swertiajaponina, que são flavonóides já identificados na espécie *E. grandiflorus*.

5.3 Efeito do chá das folhas de *E. macrophyllus*, extrato bruto e frações semipurificadas sobre a diurese em ratos normais

Os efeitos clássicos da furosemida, de aumentar a diurese, e do hormônio antidiurético, de reduzi-la, validaram o protocolo experimental aqui utilizado, uma vez que ambos foram eficazes mesmo em animais sob expansão de volume, procedimento empregado nas séries experimentais onde apenas a diurese foi investigada.

A expansão de volume (4% do peso corporal) a que os ratos foram submetidos, nesse estudo, implicou em uma produção de urina que permite o

estudo dos efeitos, sobre a diurese, de agentes que induzem tanto aumento, quanto diminuição do volume de urina eliminado, pois o volume de urina obtido após a mesma não é o menor nem o maior volume possível de se obter com expansões de volume crescentes (Diniz *et al.*, 2009). Esta manobra é utilizada para permitir a avaliação da produção de urina em um período de tempo mais curto (minutos a horas).

O chá das folhas de *E. macrophyllus*, embora estatisticamente não significante, interferiu na eliminação de urina de forma ambígua, ou seja, aumentou volume de urina quando na menor dose (2,5%) e o reduziu quando na dose mais alta (10%). Este chá, usado como diurético, é normalmente preparado na medicina popular utilizando-se a água como solvente. A água, por reduzir a osmolalidade plasmática e, conseqüentemente, o nível plasmático de hormônio antidiurético produz aumento do volume de urina, o que poderia ser o responsável pelo efeito diurético popularmente atribuído ao chá. Neste trabalho, o chá foi preparado em NaCl 0,9% para que a osmolalidade plasmática não fosse afetada. Como resultado, o chá assim preparado, parece não ser eficaz para afetar a diurese, podendo inclusive promover antidiurese. Também, há que se levar em consideração que em nosso estudo: i) as doses utilizadas podem ter sido menores do que aquelas utilizadas na medicina popular, já que não existe qualquer relato sobre as mesmas e ii) foi utilizada uma única dose do chá, o que difere da utilização popular que normalmente se faz com mais doses por tempo mais prolongado.

O extrato bruto que é um extrato concentrado, exibiu um efeito antidiurético dose dependente mais pronunciado o que, a exemplo do chá, está em desacordo com o efeito diurético atribuído, na medicina tradicional, à *E. macrophyllus*. Como anteriormente mencionado para o chá, o EB também foi preparado em NaCl 0,9% e foi administrado a ratos sob expansão de volume também com NaCl 0,9%, de modo a preservar a osmolalidade plasmática e, assim qualquer efeito observado poderia ser atribuído ao EB. Novamente, não podemos desconsiderar a inexistência de dados sobre as doses usualmente utilizadas podendo, as doses aqui usadas não terem qualquer relação com as mesmas. Relatos sobre o efeito antidiurético de espécies vegetais são raros na literatura. No estudo de Diniz *et al.* (2009) foi mostrado que, enquanto o extrato bruto das raízes de *Ampelozizyphus amazonicus* (cerveja de índio), planta nativa da Brasil, possui atividade diurética,

as saponinas dele isoladas, exibem ação antidiurética. Efeito ambíguo sobre a diurese também foram exibidos pelas frações FB e FAq obtidas do fracionamento do EB das folhas de *E. macrophyllus*. Ou seja, o efeito dessas frações apresentaram um perfil de estimulação da diurese quando em doses baixas, e de inibição da mesma quando em doses mais elevadas. Embora tenham apresentado tal perfil, as diferenças não foram estatisticamente significativas com o número de ratos usados no estudo. Já a fração FAE apresentou perfil apenas de inibição da diurese, mesmo que também não tenha tido significância estatística. Esse perfil de efeito da FAE pode, pelo menos em parte, explicar o efeito antidiurético observado com o extrato bruto.

5.4 Efeito do extrato bruto das folhas de *E. macrophyllus* e de suas frações FAE e FB sobre o peso corporal, peso dos rins e ingestão de água em ratos com necrose tubular

O protocolo para indução de necrose tubular aguda (NTA) com gentamicina constitui em um modelo confiável de NTA já validado em nosso laboratório (Pacheco, 2009), o qual está de acordo com dados relatados na literatura para este modelo (Silan *et al.*, 2007; Ali *et al.*, 2009).

O EB e suas frações FAE e FB não afetaram o peso corporal tanto em ratos normais como em ratos que receberam GT. Pacheco (2009) verificou que a GT, no mesmo modelo utilizado neste estudo, provocava uma diminuição no ganho de peso ao final do tratamento com GT, observação esta diferente da aqui obtida. Semelhantemente, ao peso corporal, o peso dos rins não foi afetado pelo EB nem pelas frações FAE e FB em ambos ratos normais e tratados com GT. Porém, o simples tratamento com GT levou a um aumento do peso dos rins quando em comparação com os ratos normais (grupo Sal Sal), o que está de acordo com dados já descritos na literatura (Ali *et al.*, 2009). Este aumento é devido à ação da GT que causa edema do órgão na fase de implantação da NTA, o qual pode estar associado a um processo inflamatório local onde ocorre aumento de prostanoídes como prostaglandinas e tromboxano A2 (Papanikolaou *et al.*, 1992).

A ingestão de água é um parâmetro variável, pois depende do grau de hidratação do animal. Em nosso estudo, foi observado que apenas os grupos que

receberam GT tiveram uma maior variação no volume de água ingerida, principalmente, no final do experimento.

5.5 Efeito do extrato bruto das folhas de *E. macrophyllus* e de suas frações FAE e FB sobre a função renal em ratos com necrose tubular

O EB e suas FAE e FB não produziu qualquer alteração na concentração plasmática de creatinina nos ratos normais. Esta observação está de acordo com os resultados obtidos para o clearance de creatinina, que também não foi afetado pelo EB e frações.

A GT, por si só, aumentou a concentração plasmática de creatinina e reduziu, simultaneamente, o clearance de creatinina quando em comparação com o grupo de ratos normais (Sal Sal). Estas observações estão em concordância com os relatos de diversos outros autores (Ali *et al.*, 2009; Pacheco, 2009; Banday *et al.*, 2008; Ghaznavi & Kadkhodaei, 2007) e são características da lesão tubular induzida pela GT. O EB, por 7 dias, reverteu tanto o aumento da creatinina plasmática, quanto a redução do clearance de creatinina provocados pela GT, indicando um efeito benéfico do EB na melhoria da função glomerular. Observação similar já havia sido obtida em nosso laboratório, uma vez que o EB (30 mg/kg) administrado simultaneamente à indução da NTA com GT exibiu efeito protetor já que evitou a queda no clearance de creatinina em resposta à GT (dados ainda não publicados).

Um outro marcador de função renal é a uréia plasmática. Assim, quando a concentração plasmática de uréia encontra-se elevada, pode ser um indicativo de disfunção renal. Em nosso estudo, apenas os grupos que receberam GT apresentaram uréia plasmática elevada após a indução de NTA, a qual permanecia alta até o 4º dia após o término da indução, a queda da uréia no final do experimento pode ser devido recirculação deste marcador. Este aumento na uréia plasmática causada pela GT também já foi evidenciada por outros autores (Adeneye *et al.*, 2008; Shirwaikar *et al.*, 2004; Verporten *et al.*, 1998). O EB e suas FAE e FB não produziu qualquer alteração na concentração plasmática de uréia tanto em ratos normais como em ratos com NTA.

A proteinúria intensa é um indicativo de lesão glomerular ou tubular. A exemplo do observado para a creatinina e uréia plasmáticas, o EB e suas FAE e FB não produziu qualquer alteração na excreção urinária de proteínas nos ratos normais. Mas, nos grupos que receberam GT, houve uma proteinúria intensa que persistiu até o 4º dia após o término da indução. E esta proteinúria é causada pelo agravamento da lesão renal causada pela GT. Observação similar com a GT já foi relatada por outros autores. (Papanikolaou *et al.*, 1992; Banday *et al.*, 2008). A FB foi capaz de reverter, de forma acentuada, o aumento na proteinúria no 4º dia de tratamento com a mesma, indicando que substâncias presentes na FB, como as saponinas, podem melhorar o dano glomerular e/ou tubular provocado pela GT. Tal efeito não foi observado com o EB nem com a fração FAE.

O agravamento da lesão renal pode ser avaliado pela relação UP:C, que corresponde à razão entre proteinúria e creatinina urinária. A GT aumentou esta relação, aumento este não afetado pelo EB e suas frações FAE e FB.

Em relação ao fluxo urinário verificamos um aumento em todos os grupos onde a NTA foi induzida (grupos GT Sal, GT EB, GT FAE e GT FB) quando comparados aos grupos que não sofreram a indução de NTA. Esta poliúria é característica da administração de GT e confirma os dados já descritos na literatura (Ali *et al.*, 2009; Bae *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2001). Uma possível explicação para a poliúria em ratos com NTA, é que a GT impede a formação de AMP cíclico, o que reduz a mobilização das aquaporinas para a membrana apical das células principais, promovendo a diminuição da reabsorção de água no ducto coletor e levando a um aumento na excreção de água (Lee *et al.*, 2001).

Um aumento na fração de excreção de água nos ratos normais foi observada em resposta apenas à fração FB após 7 dias de tratamento. Este aumento pode estar relacionado com a possível presença de saponinas e outros compostos que se encontram em baixas concentrações no EB. Nos grupos tratados com GT, como já era de se esperar, houve aumento na fração de excreção de água, pois esta medida é inversamente proporcional ao clearance de creatinina. Esta relação é bastante visível no grupo GT EB onde o EB reverteu a queda do clearance de creatinina induzida pela GT o que refletiu em uma diminuição da fração de excreção de água.

O EB e a FB parecem exibir um efeito tubular em ratos normais já que aumentaram a fração de excreção de sódio. A FAE não produziu qualquer

alteração detectável nesse parâmetro. A GT, por si só, aumentou a fração de excreção de sódio, a qual permaneceu elevada até o 7º dia após o término da indução. Este resultado está de acordo com dados relatados por outros autores (Bae *et al.*, 2007; Cuzzocrea *et al.*, 2002; De- Barros e Silva *et al.*, 1992). O EB, por 7 dias, reverteu o aumento na fração induzida pela GT. Contrariamente, tanto a FAE, como a FB potenciaram esse aumento já aos 4 dias de tratamento.

A fração de excreção de potássio, em ratos normais, foi afetada somente pela fração FB, que aumentou tal excreção aos 7 dias de tratamento. A FAE e a FB não produziram qualquer alteração detectável na excreção desse eletrólito. A GT, por si só, aumentou a fração de excreção de sódio, aumento este, não completamente sustentado até o fim do experimento (7 dias). Esses dados para o potássio estão de acordo com aqueles obtidos por outros autores ao utilizarem GT (Watson *et al.*, 1983; Silan *et al.*, 2007). O EB foi capaz de reverter a fração de excreção de potássio nos ratos com NTA a valores similares aos valores basais (ACL).

De acordo com dados da literatura, o aumento nas frações de excreção de sódio e potássio se deve à necrose do túbulo proximal promovida pela ação nefrotóxica da GT (Banday *et al.*, 2008; Silan *et al.*, 2007; Cuzzocrea *et al.*, 2002).

A análise histopatológica do rim direito dos ratos dos grupos Sal EB, Sal FAE e Sal FB mostrou aspecto morfológico normal, com preservação da arquitetura do parênquima renal, mostrando que a espécie quando utilizada em ratos normais, neste protocolo, não induz nenhum tipo de dano renal. Nos animais do grupo GT-Sal foi observada nefrite intersticial crônica e necrose tubular focais, caracterizadas por infiltrado inflamatório de células mononucleares, junto aos túbulos proximais. O mesmo aspecto histopatológico foi observado com a mesma intensidade nos animais do grupo GT-EB e dos grupos GT FAE e GT FB. A lesão apresentada é devido à implantação e o desenvolvimento da necrose tubular aguda provocada pela gentamicina.

Em resumo, os nossos resultados mostram que, sob as condições por nós utilizadas, embora a *E. macrophyllus* não tenha induzido o efeito esperado sobre a diurese, ela mostrou-se eficaz na melhoria da função glomerular que foi prejudicada pelo GT. Isto foi evidenciado pelo efeito do EB sobre a creatinina plasmática e o clearance de creatinina. O EB da *E. macrophyllus* também parece

ter um efeito tubular benéfico pois foi capaz de reduzir a excreção de sódio e potássio que se encontrava elevada em resposta à GT.

6 CONCLUSÃO

6.1 Controle de qualidade da folhas de *E. macrophyllus*, obtenção do extrato bruto e frações

O controle de qualidade utilizado foi muito importante para garantir a qualidade e identidade do material estudado. Estas análises são de grande importância, pois reflete diretamente nos resultados obtidos durante os experimentos. A identificação de flavonóides por CCD e HPLC foi importante, pois podemos utilizar estes flavonóides, principalmente a vitexina como marcador químico desta espécie.

6.2 Efeitos de doses crescentes do chá das folhas de *E. macrophyllus*, extrato bruto e frações semi purificadas sobre o fluxo urinário em ratos normais

O protocolo utilizado por nos foi eficaz para determinar a possível atividade diurética da espécie vegetal. Com nossos resultados concluímos que o chá não possui ação diurética e nem antidiurética. Já o extrato bruto exerceu uma ação antidiurética nas doses de 300 e 1000 mg/kg, e esta ação pode estar associada a diversos componentes contidos nas frações.

6.3 Indução de NTA com gentamicina e avaliação do efeito da administração de extrato bruto (EB), fração acetato de etila (FAE), fração N-butanólica (FB) sobre a função renal em ratos normais e em ratos com IRA.

O modelo de indução de necrose tubular aguda (NTA) pelo uso de gentamicina (80mg/Kg/dia BID, sc, 5 dias) utilizado em nosso laboratório foi eficiente uma vez que as alterações nos parâmetros renais que indicam lesão renal foram caracterizadas pelo aumento na concentração plasmática de creatinina, redução no RFG, aumento fluxo urinário, aumento na fração de

excreção de água, aumento na fração de excreção de sódio e potássio, aumento na proteinúria e na uréia plasmática. Sendo assim estes resultados encontrados são devidos apenas pela ação da gentamicina.

Em relação ao extrato bruto verificamos que ele possui uma ação muito importante sobre o RFG, concentração de creatinina plasmática, $FENa^+$ e FEK^+ melhorando o quadro da filtração glomerular e excreção desses eletrólitos no final do experimento, esta ação por parte é auxiliada por componentes da fração FB.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-RAHEEM, I.T; ABDEL-GHANY, A.A; MOHAMED, G.A. Protective effect of quercetin against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Biol Pharm Bull.*32(1):61-7,2009.

ADENEYE, A.A; BENEBO, A.S. Protective effect of the aqueous leaf and seed extract of *Phyllanthus amarus* on gentamicin and acetaminophen-induced nephrotoxic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 118: 318–323, 2008.

AISSAOUI, A; EL-HILALY, J; ISRAILI, Z.H; LYOUSSI, B. Acute diuretic effect of continuous intravenous infusion of an aqueous extract of *Coriandrion sativum* L in anesthetized rats. *Journal of Ethnopharmacology*. n 115, p 89-95, 2008.

AI ALL, M; WAHBI, S; TWAIJ, H; AI BADR, A. *Tribulus terrestris*: preliminary study of its diuretic and contractile effects and comparison with *Zea mays*. *Journal of Ethnopharmacology* v.85, p.257–260, 2003.

AL-AZZAM, S.I; ABDUL-RAZZAK, K.K; JARADAT, M.W. The nephroprotective effects of pioglitazone and glibenclamide against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats: a comparative study. *Journal Chemother.* 22(2):88-91, 2010.

ALI, B.H; AL-SALAM, S; AL-HUSSEINI, I; NEMMAR, A. Comparative protective effect of N-acetylcysteine and tetramethypyrazine in rat with gentamicin nephrotoxicity. *J.Appl. Toxicol.* v.29, p 302-307, 2009.

ASSAEL, B. M; CHIABRANDO, C; GAGLIARDI, L; NOSEDA, A; BAMONTE, E; SALMONA, M. Prostaglandins and aminoglycoside nephrotoxicity. *Toxicol. App. Pharmac.* 78, 386-394, 1985.

AKERELE, O. The World Health Organization traditional medicine programme: policy and implementation. *International Traditional Medicine Newsletter*, 1 (1): 1 - 3, 1985.

BAE, E.H; OH, Y.W; PARK, J.W; MA, S.K; LEE, J.U; KIM, S.H; KIM, S.W. Gentamicin decreases guanylyl cyclase activity in rat glomerulus. *Kidney and Blood Pressure Research.* 30:81-87, 2007.

BANDAY, A.A; FAROOQ, N; PRIYAMVADA, S; YUSIFU, A.N.K; KHAN, F. Time dependent effects of gentamicin on the enzymes of carbohydrate metabolism, brush border membrane and oxidative stress in rat kidney tissues. *Life Sciences* 82, 450-459, 2008.

BARROS, Z.A; PIMENTA, D.S; FIGUEIREDO, M.R; TIBIRIÇA, E. Efeitos hemodinâmicos do extrato bruto de *Echinodorus grandiflorus* em ratos normotensos e hipertensos. In: XVI Reunião Anual da FeSBE, 1999. Caxambú, MG. Resumos da XVI Reunião Anual da FeSBE, Caxambú, MG. p. 202, 1999.

BISWAS, S; MURUGESAN, T; MAITI, K; GHOSH, L; PAL, M., SAHA, B.P. Study on the diuretic activity of *Strychnos potatorum* Linn. seed extract in albino rats. *Phytomedicine* v.8, 469–471, 2001.

BOIM, M.A; SANTOS, O.F.P; SCHOR, N. Insuficiência Renal aguda: etiologia, diagnóstico e tratamento. In: SROUGI, M; SCHOR, N. Nefrourologia do adulto. São Paulo. Sarvier, p. 20-60, 1998.

BUYUKAFSAR, K; YAZAR, A; DUSMEZ, D; OZTURK, H; POLAT, G; LEVANT, A. Effect of trapidil, an antiplatelet and vasodilator agent on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Pharmacol Res.*44(4): 321-8, 2001.

BRANDÃO, M. G. L; COSENZA, G. P; GRAEL, C.F; NETTO JÚNIOR, N.L; MONTEMOR, R. Traditional uses of American plant species from the 1st edition of Brazilian Official Pharmacopoeia. *Revista Brasileira de Farmacognosia.* v 19, p. 478-4, 2009.

BRENNER, BM; BRADY, HR; LIEBERTHAL, W. Acute renal failure: Pathogenesis of renal disease. In: Brenner BM. The Kidney. Philadelphia, Penn: WB Saunders Company, 1201-1262, 2000.

CARDOSO, G.L.C; PEREIRA, N.A; LAINETTI,R. Avaliação das atividades antinociceptiva, antiinflamatória e diurética de chapéu-de-couro (*Echinodorus grandiflorus*). *Revista Brasileira de Farmácia,* v.84, n.1, p.5-7, 2003.

CORREA, M.P. Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura. Pag 214- 215, 1984.

CONGER, J. Prophylaxis and treatment of acute renal failure by vasoactive agents: the fact and the myths. *Kidney Int Suppl.*64:S23-6. 1998.

COJOCEL, C; DOCIUS, N; MAITA, K; SMITH, JH; HOOK, JB. Renal ultrastructural and biochemical injuries induced by aminoglycosides. *Environ Health Perspect.* 57:293-9, 1984

CUZZOCREA, S; MAZZON, E; DUGA, L; SERRIANO, I; PAOLA, R.D; BRITTI, D; SARRO, A.D; PIERPAOLI, S; CAPUTI, A.P; MASINI, E; SALVEMINI, D. A role for superoxide in gentamicin- mediated nephropathy in rats. *European Journal of pharmacology,* 450: 67-76, 2002.

CHEN, JL; ZHOU, T; CHEN, WX; ZHU, JS; CHEN, NW; ZHANG, MJ; WU, YL. Effect of tetramethylpyrazine on P-selectin and hepatic/renal ischemia and reperfusion injury in rats. *World J Gastroenterol,* 9 (7):1563-6, 2003.

CHOEI, D.D; LONGNECKER, D.S; DEL CAMPO, A.A. Acute and chronic cisplatin nephrotoxicity. *Lab. Invest*, v. 44, p.397-402, 1981.

DEVIPRIYA, S; SHYAMALADEVIM, C.S. Protective effect of quercetin in cisplatin induced cell injury in the rat kidney. *Indian Journal of Pharmacology*, 31: 422-426, 1999.

DE-BARROS-E-SILVA, ML; VARANDA, W.A; LACHAT, J.J; ALVES-DA-SILVA, C.G; COIMBRA, T.M. Glomerular permeability to macromolecules in gentamicin-treated rats. *Braz J Med Biol Res*. 25(4):409-17, 1992.

DINIZ, L. R. L; SANTANA, P. C; RIBEIRO, A. P. A. F; PORTELLA, V. G; PACHECO, L. F; MEYER, N. B; CESAR, I. C; COSENZA, G. P; BRANDÃO, M. G. L; VIEIRA, M. A. R. Effect of triterpene saponins from roots of *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke on diuresis in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 123, p. 275-279, 2009.

DUTRA, R.C; TAVARES, C.Z; FERRAZ, S.O; SOUZA, O.V; PIMENTA, D.S. Investigação das atividades analgésicas e antiinflamatória do extrato metanólico dos rizomas de *Echinodorus grandiflorus*. *Revista Brasileira de Farmacognogia*, 16 (4): 469-474, Out/Dez, 2006.

DHANARAJAN, R; ABRAHAM, P; ISAAC, B. Protective Effect of Ebselen, a Selenoorganic Drug, against Gentamicin-Induced Renal Damage in Rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 99, 267–272, 2006.

Farmacopéia Brasileira. 1ª edição. São Paulo: Editora Nacional, 1926.

Farmacopéia Brasileira. 2ª edição. São Paulo, 1959.

Farmacopéia Brasileira. 4ª edição. São Paulo: Atheneu. 1988-1996.

FANTONE JC, WARD PA. Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. *Am J Pathol*. 107(3):395-418, 1982.

FAROMBI, E.O; EKOR, M. Curcumin attenuates gentamicin-induced renal oxidative damage in rats. *Food and Chemical Toxicology*. 44, 1443–1448, 2006.

FUKUDA, Y; MALMBORG, A. S; APERIA, A. Gentamicin inhibition of Na-K-ATPase in rat kidney cells. *Acta Physiol. Scand*. 141, 27-34, 1991.

GRAZNAVI, R; FAGHIHI, M; KADKHODAEI, S; SHAMS, S; KHASTAR, H. Effects of nitric oxide on gentamicin toxicity in isolated perfused rat kidneys. *J nephrol*, 18:548-552, 2005.

HAYNES, R.R; NIELSEN, L.B.H. Flora Neotropica: monograph 64 – The Alismataceae, NewYork: New York Botanical Garden, 105 p, 1994

HANNEMAM, J; BAUMANN, K. Nephrotoxicity of cisplatin,carboplatin and transplatin. A comparative in vitro study. *Arch Toxicol*,64:393-400, 1991.

HALOUI, M; LOUEDEC, L; MICHAEL, J.B; LYOUSSI, B. Experimental diuretic effects of *Rosmarinus officinalis* and *Centaurium erythraea*. *Journal of Ethnopharmacology* v.71, p.465–472, 2000.

HALLIWELL B, GUTTERIDGE JM. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys*. 280(1):1-8. Review, 1990.

HISHIDA, A; NAKAJIMA, T; YAMADA, M; KATO, A; HONDA, N. Roles of hemodynamic and tubular factors in gentamicin-mediated nephropathy. *Ren Fail.*;16(1):109-16, 1994.

HOFMEISTER R.; BHARGAVA, A.S.; GUNZEL, P. Value of enzyme determination in urine for the diagnosis of nephrotoxicity in rats. *Clinica Chimica Acta*, v 160 , 163-167, 1986.

HOLT, S; MOORE, K. Pathogenesis of renal failure in rhabdomyolysis: the role of myoglobin. *Exp. Nephrol*. v. 8, p.72-76, 2000.

JEYANTHI, T; SUBRAMANIAN, P. Nephroprotective effect of *Withania somnifera*: a dose-dependent study. *Renal Fail*, v 31(9):814-21, 2009.

JÚNIOR, I.F.S; RANGEL, T.E; SANTOS, S.R; LIMA, J.C.S; MARTINS, D.T.O. Avaliação da atividade antibacteriana dos extratos hidroalcoólicos de *Aspidosderma subincanum* Mart (Guatambu) e *Echinodorus macrophyllus* Michell-(chapéu de couro) pelo método de microdiluição. In: XVIII SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 2004. Manaus/AM. Livro de resumo do XVIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Manaus/AM. p.136, 2004.

KADKHHODAE, M; KHASTAR, H; FAGHIHI, M; GHAZNAVI, R; ZAHMATKESH,M. Effects of co-supplementation of vitamins E and C on gentamicin-induced nephrotoxicity in rat. *Exp Physiol*, 90: 571-576, 2005.

KARADENIZ, A; YILDIRIM, A; SIMSEK,N; KALKAN, Y; CELEBI, F. Spirulina platensis protects against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Phytotherapy Res*. v.22, p.1506-10, 2008.

KARAHAN, I; ATESSAHIM, A; YILMAZ, S; CERIBASI, A.O. Protective effect of lycopene on gentamicin-induced oxidative stress and nephrotoxicity in rats. *Toxicology*. v 215 (2): 198-204, 2005.

KOBAYASHI, J; SEKIGUNCHI, M; SHIGEMORI, H; OHSKI, A. Echinophyllins A and B, novel nitrogen-containing clerodane diterpenoids from *Echinodorus macrophyllus*. *Tetraedron Letters*, v 41: 2939-2943, 2000.

KO, R.J. Causes, epidemiology, and clinical evaluation of suspected herbal poisoning. *Clin. Toxicol*, v.37,n.6: 697-708,1999.

KOPPLE, JD; DING, H; LETOHA, A; IVANYI, B; QING, DP; DUX, L; WANG, H; SONKODI, S. L-carnitine ameliorates gentamicin-induced renal injury in rats. *Nephrol Dial Transplant*. 17: 2122–2131, 2002.

KREYDIYYEH, S.I; USTA, J. Diuretic effect and mechanism of action of parsley. *Journal of Ethnopharmacology* v.79, 353–357, 2002.

LAURENT, G; CARLIER, M. B; ROLLAN, B; VAN HOOFF, E; TULBENS, P. Mechanism of aminoglycoside-induced lysosomal phospholipidosis: in vitro and in vivo studies with gentamicin and amikacin. *Biochem. Pharmac.* 31, 3861-3870, 1982.

LESSA, M.A; TIBIRIÇA, E; ALMEIDA, A; CAILLEAUX, S; PIMENTA, D.S; KAPLAN, M. A; FIGUEIREDO, M.R. Antihypertensive effects of crude extract from leaves of *Echinodorus grandiflorus*. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 22 :161–168, 2008.

LEITE, JP; PIMENTA, D.S; GOMES, R.S.D.L; BARROS, A.M.D. Contribuição do estudo farmacobotânico da *Echinodorus macrophyllus* (Kunth) Micheli (Chapéu de couro) Alismataceae. *Revista Brasileira de Farmacognogia*, v 17 (2): 242-248 Abr/Jun, 2007.

LEE JU, YOO KS, KANG DG, KIM SW, CHOI KC. Gentamicin decreases the abundance of Aquaporin Channels in rat kidney. *Jpn J Pharmacol.* 85, 391-398, 2001.

LOPES, LC; ALBANO, F; LARANJA, GAT; ALVES, LM; SILVA, LFM; SOUZA, GP; ARAUJO, IM; NOGUEIRA, JF. Toxicological evaluation by in vitro and in vivo assays of aqueous extract prepared from *Echinodorus macrophyllus* leaves. *Toxicology letters*, 116: 189-198, 2000.

LORENZI, H; MATOS, F.J.A.. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, 2002.

MANNS, D; HARTMANN, R. Echinodol: a new cembrane derivative from *Echinodorus grandiflorus*. *Planta Medica* 59: 465-466, 1993.

MARTÍNEZ-SALGADO, C; RODRÍGUEZ-BARBEIRO, A; RODRÍGUEZ-PUYO, D; PÉREZ DE LEMA, G; LÓPEZ-NOVOA, J.M. Involvement of phospholipase A2 in gentamicin-induced rat mesangial-induced rat mesangial cell activation. *Am JPhysiol*, 273(1):60-6, 1997.

MAZZON, AE; BRITTI, B.D; DE SARRO, A.C; CAPUTI, A.P; CUZZOCREA, S. Effect of N-acetylcysteine on gentamicin-mediated nephropathy in rats. *European Journal of Pharmacology*, v 424, 75–83, 2001.

MELIS, M.S. Chronic administration of aqueous extract of *Stevia rebaudiana* in rats: renal effects. *Journal of Ethnopharmacology* v.47,129–134, 1995.

MONTINE, T.J; BOURCH, R.F. Renal toxicity of amntineoplastic agent. *Toxicology letters*. v .53, (1-2), p.93-96,1990.

NAIDU, M.U; SHIFOW, A.A; KUMAR, K.V; RATNAKAR, K.S. Ginkgo biloba extract ameliorates gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Phytomedicine*, 7(3):191-197,2000.

NISSENSON, AR. Acute renal failure: definition and pathogenesis. *Kidney Int Suppl*. 66:S7-10, 1998.

NUNES, G.P; SILVA, M.F; RESENDE, U.M; SIQUEIRA, J.M. Plantas medicinais comercializadas por raizeiros no Centro de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 13: 83-92, 2003.

OLIVEIRA, J.F.P; CIPULLO, J.P; BURDMANN, E.A. Nefrotoxicidade dos aminoglicosídeos. *Braz J Cardiov surgey*, 21 (4):444-452, 2006.

OLIVEIRA, VCR; TEJOS, CR; HOSAKA, EM; ANDRADE, SC; ARAÚJO, M; VATTIMO, MFF. Influence of the dose regimen on the gentamicin nephrotoxicity in rats. *Revista da Escola de Enfermagem USP*, 35 (2) p. 200-4, 2001.

PAPANIKOLAOU, N; PEROS, G; MORPHAKE, P; GKIKAS, G; MARAGHIANNE, D; TSIPAS, G; KOSTOPOULOS, K; ARAMBATZE, C; GKIKAS, EL; BARIETY, J. Does gentamicin induce acute renal failure by increasing renal TXA2 synthesis in rats? *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 45(2):131-6, 1992.

PARSONS, P.P; GARLAND,H.O; HARPUR, E.S. Localization of the nephron site of gentamicin-induced hypercalciuria in the rat:a micropuncture study. *British Journal of Pharmacology*, v 130: 441-449, 2000.

PACHECO, L.F. Função Renal em Ratos com Necrose Tubular Aguda Induzida por Gentamicina sob a Infusão de Angiotensina (1-7), 2009. Tese apresentada no programa de Pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia-ICB/UFMG, Belo horizonte-MG, 2009.

PIMENTA, D.S; AMARAL, A.C.F; FIGUEIREDO, M.R; KAPLAN, M. A.C. Investigação da atividade hipotensora de extratos brutos de *Echinodorus grandiflorus* Micheli- Chapéu de couro. I Bienal de pesquisa da FIOCRUZ/RJ. P.88, 1998.

PIMENTA, D.S; FIGUEIREDO, M.R; KAPLAN, M. A.C. Chemical studies on cultivation of *Echinodorus grandiflorus* . *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 72(2): pag 294, 2000.

PIMENTA, D.S. Contribuição a ecologia, cultivo e validação do uso de *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schultdl.) Micheli (Chapéu de Couro). Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz para obtenção do grau de Doutor. Rio de Janeiro: 179 p, maio 2002.

PIMENTA, D.S; FIGUEIREDO, M.R; KAPLAN, M. A.C. Essencial oil from two populations of *Echinodorus grandiflorus* (Cham. Schetal Micheli) Chapéu de Couro. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 78(4): p 623-628, 2000.

POLAT, A; PARLAKPINAR, H; TASDEMIR, S; COLAK, C; VARDI, N; UCAR, M; EMRE, M.H; ACET, A. Protective role of Aminoguanidine on gentamicin-induced acute renal failure in rats. *Acta histochemica*. v 108 ,365-371, 2006.

PORTELA, V.G. Desenvolvimento da Insuficiência Renal Promovida pela sepse induzida pelo modelo de CLP (*Cecal ligation and puncture*): avaliação morfológica e de parâmetros renais e inflamatórios. Tese apresentada no programa de Pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia-ICB/UFMG, Belo horizonte-MG, 2009.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. *Toxicon*, v. 39, p.603-613, 2001.

RIBEIRO, R.A; BARROS, F; MELO, M.M.R.F; CHIEIA, S; WANDERLEY, M.G; GOMES, C; TROLIN, G. Acute diuretic effects in conscious rats produced by some medicinal plants used in the state of São Paulo, Brasil. *Journal of Ethnopharmacology*, v.24, p.19-29,1988.

ROBBERS, J.E; SPEEDIE, M.K; TYLER, V.E. Pharmacognosy and pharmacobiotechnology. Baltimore: Willians &Wilkins: p.1-14, 1996.

ROGERS RA, HANNA AY, RIVIERE JE. Dose response studies of gentamicin nephrotoxicity in rats with experimental renal dysfunction. III. Effects of dosage adjustment method. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*. 57(3): 01-11, 1987.

SABINO, K.C.C; PINTO, A.C; REGO, G.C.G; SIQUEIRA, A.M; CARDOSO,C.C; REIS,P.A; MARQUES,E.A; COELHO,M.G.P. Immunosupressive effects of *Echinodorus macrophyllus* aqueous extract. *Journal of Ethnopharmacology*, v 111:435-439, 2007.

SEGURO, AC; YU, L; BURDMANN, E; HELOU, C.M.B; ZATZ, R. Insuficiência Renal Aguda.In: Zatz R. Fisiopatologia Renal. São Paulo (SP): Atheneu; 2000. p.261-82.

SILAN, C; UZUN, N; COMUNOGLU, N.U; GOKCEN, S; BERDIRHAN, S. Gentamicin-induced nephotoxicity in rats amelirated and healing effects of resveratrol. *Biol Phram Bull* v 30 (1), 79-83, 2007.

SIMÕES, C.O.M; SCHENKEL, E.P; GOSMANN, G; MELLO, J.C.P; MENTZ, L.A; PETROVICK, P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS/UFCS, p. 822, 1999.

SINGH, P; SRIVASTAVA, M.M; KHEMANI, L.D. Renoprotective effects of *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees in rats. *Ups J Med Sci.* v 114(3):136-139, 2009.

SOHN, E.J; KANG, D.G; LEE, H.S. Protective Effects of Glycyrrhizin on Gentamicin-Induced Acute Renal Failure in Rats. *Pharmacology & Toxicology.* 93, 116–122, 2003.

SCHNITZLER, M; PETEREIT, F; NAHRSTEDT, A. Trans-Aconitic acid, glucosylflavones and hydroxycinamoyltartaric acids from the leaves of *Echinodorus grandiflorus* ssp. *Aures*, a Brazilian medicinal plant. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 17(2): 149-154, 2007.

SCHENKEL, E.P; GOSMANN, G; PETROVICK, P.R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C.M.O; SCHENKEL, E.P; GOSMANN, G.M; MELLO, J.C.P; MENTZ, L.A; PETROVICK, P.R. Orgs. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 2 Ed. Florianópolis. UFSC; Porto alegre: UFRGS, cap.15,p.291-320, 2000.

SCHULZ, V; HANSEL, R; TYLER, V.E. Medicinal plants, phytomedicines and phytotherapy. In: Rational phytotherapy: a physician's guide to herbal medicine. 4 ed. New York: Springer. cap 1, p. 1-39, 2001.

SHIRWAIKAR, A; ISSAC, D; MALINI, S. Effect of *Aerva lanata* on cisplatin and gentamicin models of acute renal failure. *Journal of Ethnopharmacology* v 90, p 81–86, 2004.

SRIPANIDKULCHAI, B; WONGPANICH, V; LAUPATTARAKASEM, P; SUWANSAKSRI, J; JIRAKULSOMCHOK, D. Diuretic effects of selected Thai indigenous medicinal plants in rats. *Journal of Ethnopharmacology* v.75, 185–190, 2001.

STOYKOVA, S; CASANOVA, P; LUCCIONI, F; LANZA, M. 1-year monitoring of the course of chronic renal insufficiency induced by subtotal nephrectomy in rats. Pharmacokinetic value. *Pathol Biol* v 31(7):569-76, 1983.

TIBIRIÇA, E; ALMEIDA, A; CAILLEAUX, S; PIMENTA, D.S; KAPLAN, M. A; LESSA, M.A.FIGUEIREDO, M.R. Pharmacological mechanisms involved in the vasodilator effects of extracts from *Echinodorus grandiflorus*. *Journal of Ethnopharmacology*, v 111, p 50-55, 2007.

TYLER, V.E. Natural products and medicine: an overview In: BALICK, MJ; ELISABETSKY, E; LAIRD, S.A. Medicinal resources of the tropical forest, biodiversity and its importance to human health. New York: Columbia University Press: p 3-10,1996.

VARDI, N; PARLAKPINAR, H; OZTURK, F; ACET, A. Gentamicin-induced nephrotoxicity and protective effect of caffeic acid phenethyl ester in rats. *Fundamental & Clinical Pharmacology* v 19, p 173–177, 2005.

VERPOOTEN, G.A; TULKENS, P.M; BENNETT, W.M., Aminoglycosides and vancomycin. In: De Broe, M.E., Porter, G.A., Bennett, A.M., Verpooten, G.A. (Eds.), *Clinical Nephrotoxicants, Renal Injury from Drugs and Chemicals*. Kluwer, The Netherlands, pp. 105–120, 1998.

VOLPINI, RA; COSTA, RS; DA SILVA, CG; COIMBRA ,TM. Inhibition of Nuclear Factor- κ B Activation Attenuates Tubulointerstitial Nephritis Induced by Gentamicin. *Nephron Physiol.* 98 (4): p97–p106, 2004.

ZHOU, T; LI, X; WU, P; ZHANG, D; ZHANG, M; CHEN, N; DONG, D. Effect of anti-P-selectin monoclonal antibody on renal ischemia/reperfusion injury in rats. *Chin Med Journal*, 113(9):790-3., 2000.

YOKOZAWA, T; ZHENG, P.P; OURA, H; KOIZUMI, F. Animal model of adenine-induced chronic renal failure in rats. *Nephron*, v 44(3), p.230-234, 1986.

WAGNER, H; BLADT, S. Plant drug analysis. A thin Layer Chromatography Atlas. Springer- Verlag: Berlin, Heilderberg. 348p, 1996.

WATSON, A; COFFEY, L; KEOGH, B; MCCANN, S.R. Severe hypomagnesaemia and hypocalcaemia following gentamicin therapy. *Ir Med J.* 76(9):381-3, 1983.