

RENATA ROMANEZI DA SILVEIRA

*ESTUDO DA FUNÇÃO RENAL E DE MODIFICAÇÕES DA
PRESSÃO ARTERIAL APÓS ADMINISTRAÇÃO ORAL DO
EXTRATO BRUTO DE *Vernonia polyanthes* Less.*

CAMPINAS

2001



RENATA ROMANEZI DA SILVEIRA

***ESTUDO DA FUNÇÃO RENAL E DE MODIFICAÇÕES DA
PRESSÃO ARTERIAL APÓS ADMINISTRAÇÃO ORAL DO
EXTRATO BRUTO DE *Vernonia polyanthes* Less.***

*Dissertação de Mestrado apresentada à
Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas, para
obtenção do Título de Mestre em Clínica Médica,
área de concentração Ciências Básicas.*

ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ ANTONIO ROCHA GONTIJO

COLABORADORA: Dra. MARY ANN FOGLIO

CAMPINAS

2001

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

Si39e

Silveira, Renata Romanezi da

Estudo da função renal e de modificações da pressão arterial após administração oral do extrato bruto de *Vernonia polyanthes Less* / Leda Márcia Araújo Bento. Campinas, SP : [s.n.], 2001.

Orientadores : José Antonio Rocha Gontijo, Mary Ann Foglio
Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Sódio . 2. Lítio. 3. Plantas medicinais. 4. Ratos. I. José Antonio Rocha Gontijo. II. Mary Ann Foglio. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

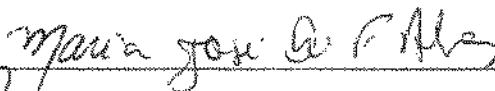
Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador(a): *Prof.Dr. José Antonio Rocha Gontijo*



Membros:

Profa.Dra. Maria José Queiroz Freitas Alves



Prof.Dr. João Ernesto de Carvalho



Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Clínica Médica, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 20/02/01

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho com muito amor para meus pais José e Shirley e minha irmã Fernanda que sempre estiveram ao meu lado dando força e apoiando minhas decisões.

Obrigada por tudo.

A Deus, por me conceder a vida e possibilitar a realização dos meus sonhos.

Ao meu orientador, José Antonio Rocha Gontijo, por permitir que esse trabalho fosse realizado em seu laboratório e pela experiência científica demonstrada durante todo o tempo.

À valiosa colaboração de Mary Ann Foglio, auxiliando na realização desse trabalho, bem como em qualquer dificuldade surgida.

Ao Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agronômicas (CPQBA) que permitiu a realização da extração da planta utilizada e a todos os funcionários que lá trabalham, pela ajuda e disposição sempre prestados.

À professora e amiga Maria José Q. F. Alves pela colaboração valiosa e amizade desde os tempos da graduação.

Ao Departamento de Clínica Médica, por me acolher durante esse período e pelo auxílio prestado.

À secretária do departamento, Renata Maia, pela colaboração, auxílio e paciência no decorrer desse anos.

À seção de pós-graduação da Faculdade de Ciências Médicas pela colaboração prestada.

A todos os professores e pesquisadores que contribuíram para a preparação da tese.

Ao Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental pela realização de toda parte experimental desse trabalho, bem como aos funcionários, em especial aos de laboratório de informática.

A todos os funcionários que colaboraram com os experimentos, em especial Neide Gaspar e Adriana Zapparoli pela imensa ajuda, atenção, amizade e carinho dispensados nesses anos.

À Comissão de Auxílio à Pesquisa e Ensino (CAPES) pelo auxílio financeiro à esse estudo.

À Fundação de Amparo ao Ensino e Pesquisa (FAEP) pelo auxílio financeiro.

Às amigas Adriana Torsoni, Adriana Vinagre, Águeda Zaratín, Cláudia Costa, Elen Suedekum, Leda Bento, Miriam Ueno, Paula Belline, Priscila Perez, Rosa Tambascia, Rosana Yuri pela ajuda e apoio que proporcionaram mais alegria durante esse período, mesmo nos momentos difíceis.

Aos amigos de graduação (Deborah, Mika, Pateta, Pinguela, Pulga, Raif, Sutura, Valéria, Xipoca) que sempre estarão presentes em minha vida, pois foi lá que tudo começou e pude superar as dificuldades graças à presença deles.

A todos meus amigos que não foram citados, mas que certamente serão sempre tratados com carinho.

Ao Leandro, por me ajudar sempre com trabalho ou simples gestos, pela paciência e amor dedicados em todo o tempo.

A todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a obtenção desse trabalho, meu muito obrigada.

*A amizade é um sentimento mais nobre do que o amor,
Eis que permite que o objeto dela se divida em outros
Afetos, enquanto o amor tem intrínseco o ciúme, que
Não admite a rivalidade, e eu poderia suportar,
Embora não sem dor, que tivessem morrido
Todos os meus amores, mas enlouqueceria
Se morressem todos os meus amigos.*

	PÁG.
RESUMO.....	xxiii
1. INTRODUÇÃO.....	27
2. OBJETIVOS.....	39
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	43
3.1. Coleta do material vegetal.....	45
3.2. Extração e caracterização do extrato vegetal de <i>Vernonia polyanthes</i> <i>Less.</i>	45
3.3. Triagem fitoquímica qualitativa.....	48
3.3.1. Soluções utilizadas.....	48
3.3.1.1. Ensaio para determinação de alcalóides.....	50
3.3.1.2. Ensaio para determinação de agliconas flavônicas.....	50
3.3.1.3. Ensaio para determinação de emodóis.....	50
3.3.1.4. Ensaio para determinação de cumarinas.....	50
3.3.1.5. Ensaio para determinação de taninos gálicos catéquicos.....	51
3.3.1.6. Ensaio para determinação de saponinas.....	51
3.3.1.7. Ensaio para determinação de triterpenos e esteróides.....	51
3.3.1.8. Ensaio para determinação de carotenóides.....	51
3.3.1.9. Ensaio para determinação de ácidos graxos.....	52
3.3.1.10. Ensaio para determinação de antracenosídeos.....	52
3.3.1.11. Ensaio para determinação de antocioninas.....	52
3.3.1.12. Ensaio para determinação de compostos redutores.....	53

3.4. Animais.....	53
3.5. Procedimento experimental.....	54
3.6. Caracterização do <i>Clearance</i> de lítio.....	55
3.7. Fórmulas e cálculos utilizados.....	58
3.7.1. <i>Clearance</i> de lítio, <i>clearance</i> de sódio e <i>clearance</i> de creatinina....	58
3.7.2. Frações de excreção (FE) de Na, K ou Li.....	58
3.7.3. Carga filtrada de Sódio (CF).....	58
3.8. Manuseio tubular de sódio.....	58
3.8.1. Aporte distal de sódio (AD).....	58
3.8.2. Reabsorção fracional proximal de sódio (RFrP).....	58
3.8.3. Reabsorção fracional distal de Na-I (RFrD-I).....	58
3.8.4. Reabsorção fracional distal de Na-II (RFrD-II).....	59
3.8.5. Fração de excreção proximal de sódio.....	59
3.8.6. Fração de excreção pós-proximal de sódio.....	59
3.9. Medida da pressão arterial.....	59
3.10. Procedimentos analíticos.....	59
3.11. Análise estatística dos resultados.....	61
3.12. Aspectos éticos.....	61
4. RESULTADOS.....	63
4.1. Estudo funcional renal.....	65
4.1.1. <i>Clearance</i> de creatinina.....	65
4.1.2. <i>Clearance</i> de lítio.....	66
4.1.3. <i>Clearance</i> de sódio.....	66
4.1.4. Fração de excreção de potássio.....	67

4.1.5. Fração de excreção de sódio.....	67
4.1.6. Fração de excreção proximal de sódio.....	68
4.1.7. Fração de excreção pós-proximal de sódio.....	68
4.2. Estudo semanal da excreção urinária hidro-salina e da pressão arterial caudal.....	69
4.2.1. Fluxo urinário por minuto (UV).....	69
4.2.2. Carga excretada de potássio (U_{KV}).....	69
4.2.3. Carga excretada de sódio (U_{NAV}).....	70
4.2.4. Proteinúria.....	70
4.2.5. Pressão arterial caudal (PAC).....	70
4.2.6. Peso corporal diário.....	71
4.3. Resultado da triagem fitoquímica.....	71
5. DISCUSSÃO.....	107
6. CONCLUSÕES.....	117
7. SUMMARY.....	121
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	125
9. ANEXOS.....	135

AD	aporte distal
CCr	clearance de creatinina
CF	carga filtrada
CLi	clearance de lítio
CNa	clearance de sódio
EB	extrato bruto
EBA	extrato bruto aquecido
EBAT	extrato bruto aquecido total
FE	fração de excreção
FEK	fração de excreção de potássio
FENa	fração de excreção de sódio
FEPNa	fração de excreção proximal de sódio
FEPPNa	fração de excreção pós-proximal de sódio
FG	filtração glomerular
FSR	fluxo sanguíneo renal
ND	nefron distal
PK	concentração plasmática de potássio
PLi	concentração plasmática de lítio
PNa	concentração plasmática de sódio
PAC	pressão arterial caudal
PC	peso corporal
RFrP	reabsorção fracional proximal

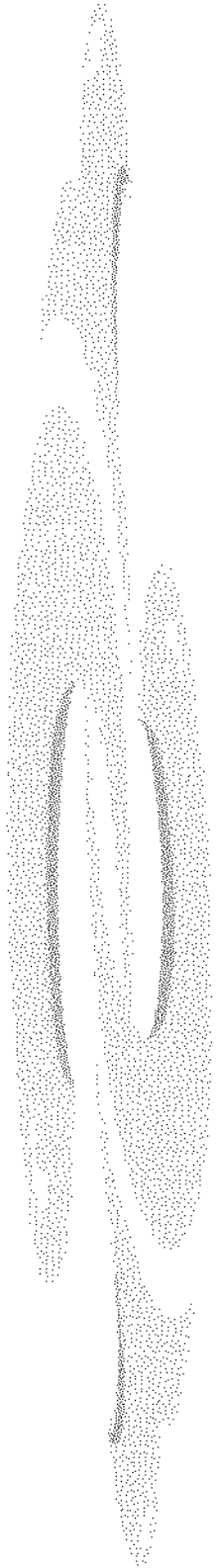
RFrD	reabsorção fracional distal
U	concentração urinária
$U_K V$	carga excretada de potássio
$U_{Na} V$	carga excretada de sódio
V'	volume urinário por minuto
UV	volume urinário

	PÁG.
Tabela 1: (<i>Clearance</i> de creatinina – 1ª semana).....	137
Tabela 2: (<i>Clearance</i> de creatinina – 2ª semana).....	138
Tabela 1': (Área sobre a curva do <i>clearance</i> após 2 semanas de tratamento)...	139
Tabela 3: (<i>Clearance</i> de lítio – 1ª semana).....	140
Tabela 4: (<i>Clearance</i> de lítio – 2ª semana).....	141
Tabela 2': (Área sobre a curva do <i>clearance</i> após 2 semanas de tratamento)...	142
Tabela 5: (<i>Clearance</i> de sódio – 1ª semana).....	143
Tabela 6: (<i>Clearance</i> de sódio – 2ª semana).....	144
Tabela 3': (Área sobre a curva do <i>clearance</i> após 2 semanas de tratamento)...	145
Tabela 7: (Fração de excreção de potássio – 1ª semana).....	146
Tabela 8: (Fração de excreção de potássio – 2ª semana).....	147
Tabela 4': (Área sobre a curva da fração de excreção de potássio).....	148
Tabela 9: (Fração de excreção de sódio – 1ª semana).....	149
Tabela 10: (Fração de excreção de sódio – 2ª semana).....	150
Tabela 5': (Área sobre a curva da fração de excreção de sódio).....	151
Tabela 11: (Fração de excreção de proximal de sódio – 1ª semana).....	152
Tabela 12: (Fração de excreção de proximal de sódio – 2ª semana).....	153
Tabela 6': (Área sobre a curva da fração de excreção proximal).....	154
Tabela 13: (Fração de excreção de pós-proximal de sódio – 1ª semana).....	155
Tabela 14: (Fração de excreção de pós-proximal de sódio – 2ª semana).....	156
Tabela 7': (Área sobre a curva da fração de excreção pós-proximal).....	157

Tabela 15:	(Volume Urinário).....	158
Tabela 16:	(Carga excretada de potássio).....	159
Tabela 17:	(Carga excretada de sódio).....	160
Tabela 18:	(Proteína Excretada).....	161
Tabela 19:	(Pressão arterial caudal).....	162
Tabela 20:	(Variação diária do peso corporal – doses de 0,5 e 1,0 g/kg).....	163
Tabela 20':	(Variação diária do peso corporal – doses de 1,0 e 1,5 g/kg).....	164

	PÁG.
Figura A: (<i>Vernonia polyanthes</i> Less.).....	47
Figura B: (Extração da planta).....	49
Figura C: (Esquema Experimental).....	57
Figura D: (Método indireto de medida pressórica).....	60
Figura 1: (<i>Clearance</i> de creatinina – 1ª semana).....	72
Figura 1': (Área sobre a curva do <i>clearance</i>).....	73
Figura 2: (<i>Clearance</i> de creatinina – 2ª semana).....	74
Figura 2': (Área sobre a curva do <i>clearance</i>).....	75
Figura 3: (<i>Clearance</i> de lítio – 1ª semana).....	76
Figura 3': (Área sobre a curva do <i>clearance</i>).....	77
Figura 4: (<i>Clearance</i> de lítio – 2ª semana).....	78
Figura 4': (Área sobre a curva do <i>clearance</i>).....	79
Figura 5: (<i>Clearance</i> de sódio – 1ª semana).....	80
Figura 5': (Área sobre a curva do <i>clearance</i>).....	81
Figura 6: (<i>Clearance</i> de sódio – 2ª semana).....	82
Figura 6': (Área sobre a curva do <i>clearance</i>).....	83
Figura 7: (Fração de excreção de potássio – 1ª semana).....	84
Figura 7': (Área sobre a curva da fração de excreção de potássio).....	85
Figura 8: (Fração de excreção de potássio – 2ª semana).....	86
Figura 8': (Área sobre a curva da fração de excreção de potássio).....	87
Figura 9: (Fração de excreção de sódio – 1ª semana).....	88

Figura 9':	(Área sobre a curva da fração de excreção de sódio).....	89
Figura 10:	(Fração de excreção de sódio – 2ª semana).....	90
Figura 10':	(Área sobre a curva da fração de excreção de sódio).....	91
Figura 11:	(Fração de excreção de proximal de sódio – 1ª semana).....	92
Figura 11':	(Área sobre a curva da fração de excreção proximal).....	93
Figura 12:	(Fração de excreção de proximal de sódio – 2ª semana).....	94
Figura 12':	(Área sobre a curva da fração de excreção proximal).....	95
Figura 13:	(Fração de excreção de pós-proximal de sódio – 1ª semana).....	96
Figura 13':	(Área sobre a curva da fração de excreção pós-proximal).....	97
Figura 14:	(Fração de excreção de pós-proximal de sódio – 2ª semana).....	98
Figura 14':	(Área sobre a curva da fração de excreção pós-proximal).....	99
Figura 15:	(Volume Urinário por minuto).....	100
Figura 16:	(Carga excretada de potássio).....	101
Figura 17:	(Carga excretada de sódio).....	102
Figura 18:	(Proteinúria).....	103
Figura 19:	(Pressão arterial caudal).....	104
Figura 20:	(Diferença percentual diário do peso).....	105



RESUMO

O presente estudo teve como objetivo, analisar o efeito do extrato bruto hidroalcoólico da *Vernonia polyanthes* Less. (assa peixe) sobre a pressão arterial caudal e a função renal após duas semanas de tratamento.

O pó obtido das folhas moídas da planta foi submetido ao refluxo com etanol 70% por 2 horas consecutivas. O material resultante foi filtrado e a solução restante foi reduzida à vácuo, resultando no extrato bruto, com rendimento de 35%. A pressão arterial e a função renal foram comparadas em dois grupos: após um período basal: controle (veículo) e experimental (extrato bruto). O extrato foi administrado por gavagem a ratos Wistar-Hannover não anestesiados pesando entre 300 a 400 gr.

A pressão arterial foi medida semanalmente em ratos acordados pelo método de pletismografia de cauda; a função renal foi estimada em gaiolas metabólicas individuais através dos métodos de *clearance* de creatinina e lítio. Os resultados foram analisados após a administração oral do extrato bruto nas doses de: 0,5; 1,0 e 1,5 g/kg/peso corporal.

O extrato foi processado de maneiras diferentes: através da extração direta do material por refluxo, testado apenas na dose de 1,0 g/kg/peso corporal ou também com uma extração a frio e um posterior refluxo, o qual foi testado nas doses de: 0,5; 1,0 e 1,5 g/kg/peso corporal. Com o estudo dessas diferentes doses, podemos notar que na dose inicial (0,5 g/kg) houve um aumento significativo no *clearance* de lítio (CLi), com valor inicial de $56,72 \pm 5,27 \mu\text{l min}^{-1} 100\text{g peso corporal}^{-1}$ para $92,26 \pm 18,26 \mu\text{l min}^{-1} 100\text{g peso corporal}^{-1}$, nessa dose ainda ocorreu um aumento na fração de excreção de sódio (FENa), que partiu de $0,19 \pm 0,03\%$ para $0,35 \pm 0,04\%$, ambos após duas semanas de tratamento.

O *clearance* de sódio (CNa) também aumentou após 30 minutos de tratamento de $0,58 \pm 0,08$ para $1,40 \pm 0,36$ após a segunda semana, não promovendo modificações significativas sobre a pressão arterial.

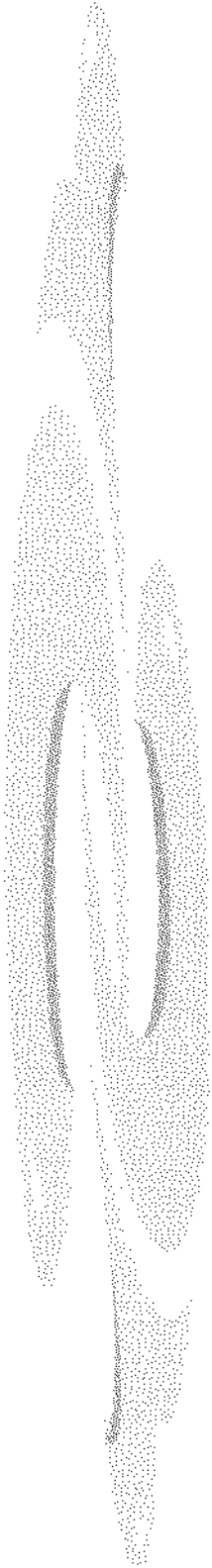
Já na dose de 1,0 g/kg/peso corporal, houve uma queda persistente e significativa da pressão arterial após 2 semanas de tratamento de $115 \pm 2,19 \text{ mmHg}$ (basal) e $115 \pm 2,16 \text{ mmHg}$ (controle) para $94 \pm 4,29 \text{ mmHg}$.

Em relação à administração de 1,5 g/kg/peso corporal, ela promoveu uma queda significativa no CNa após a primeira semana de tratamento, após os 90 minutos de experimento de $0,7 \pm 0,09$ para $0,27 \pm 0,04 \mu\text{l min}^{-1} 100\text{g peso corporal}^{-1}$ e aos 120 minutos a queda persistiu de $0,5 \pm 0,08$ para $0,22 \pm 0,04 \mu\text{l min}^{-1} 100\text{g peso corporal}^{-1}$, na pressão não ocorreu nenhuma mudança.

Na dose de testada do extrato bruto total (EBAT), a dose de 1,0 g/kg/peso corporal promoveu uma queda significativa na pressão arterial caudal após primeira semana de tratamento de $134 \pm 2,88$ mmHg para $118 \pm 3,85$ mmHg e em relação à função renal houve um aumento significativo na filtração glomerular (CCr) acompanhada por uma queda na fração de excreção de sódio (FENa) e na fração de excreção pós-proximal de sódio (FEPPNa), associada também a um aumento na fração de excreção de potássio (FEK) após a primeira e segunda semanas.

Como conclusão, podemos dizer que a dose de 1,0 g/kg (de ambos extratos) foram efetivas em promover uma significativa diminuição da pressão arterial, sugerindo que a planta estudada possa ter um efeito vascular miorelaxante sobre a musculatura lisa. Este efeito vasodilatador presumível também é sugerido pelo aumento da filtração glomerular estimado pelo CCr. Apesar deste aumento na filtração glomerular, ocorreu uma significativa diminuição na excreção urinária de sódio. Estes resultados sugerem que mecanismos de contra-regulação à queda pressórica podem promover uma forte retenção renal de sódio.

Por outro lado, a dose de 0,5 g/kg teria uma influência direta sobre a função tubular, particularmente proximal, aumentando a rejeição de sódio neste segmento.



1. INTRODUÇÃO

Toda sociedade humana acumula um acervo de informações sobre o ambiente que a cerca, que lhe possibilita interagir com este para prover suas necessidades de sobrevivência. Neste acervo, inscreve-se o conhecimento relativo ao mundo vegetal com o qual estas sociedades estão em contato (DI STASI, 1996).

Historicamente, as plantas medicinais sempre foram objeto de estudo da área denominada farmacognosia, termo que designa o estudo de todas as informações sobre medicamentos de fontes naturais (plantas, animais e microorganismos) (ROBBERS, SPEEDIE, TYLER, 1998).

Os compostos de origem natural desempenham quatro papéis importantes na medicina moderna, em primeiro lugar, fornecer alguns medicamentos extremamente úteis, cuja produção e comercialização na forma sintética é difícil, se não impossível. De fontes naturais também são retirados compostos básicos que podem ser ligeiramente modificados para tornarem-se mais eficazes ou menos tóxicos.

O terceiro papel desempenhado pelos produtos naturais é a sua utilidade como protótipos ou modelos para medicamentos sintéticos que tenham atividades fisiológicas semelhantes às dos originais. Há um quarto papel desempenhado por eles, bem diferente dos acima citados, mas não menos importante; alguns produtos naturais contêm compostos que apresentam atividade pequena ou nula em si mesmos, mas que podem ser modificados por métodos químicos ou biológicos para produzirem drogas potentes não obtidas facilmente por outros métodos (ROBBERS *et al.*, 1998).

Dentro do universo das plantas medicinais, a expressão princípio ativo, utilizada pelos profissionais que atuam na área é caracterizada como substância química obtida de produtos de origem natural e que possuem uma ou mais atividades biológicas em determinado organismo vivo. O termo também caracteriza a substância ativa de um medicamento em contraposição ao veículo ou excipiente nele contido. Esses denominados princípios ativos são também conhecidos como compostos secundários, quando obtidos de espécies vegetais, na medida que representam substâncias químicas que não participam do metabolismo primário das plantas (fotossíntese e respiração), mas que possuem funções específicas dentro daquele organismo, embora muitas destas funções ainda não tenham sido devidamente estudadas (DI STASI, 1996)..

Os metabólitos secundários ou micromoléculas – que geralmente apresentam estrutura complexa, baixo peso molecular, marcantes atividades biológicas e, diferentemente daqueles do metabolismo primário, são encontrados em concentrações relativamente baixas e em determinados grupos de plantas (von POSER & MENTZ, 2000).

Para um melhor estudo das plantas medicinais, faz-se necessário o emprego da etnobotânica. A etnobotânica também trabalha em estreita cumplicidade com outras disciplinas correlatas, pois ela é definida como estudo das relações entre povos e plantas. Outra disciplina correlata é a etnofarmacologia, que consiste na exploração científica interdisciplinar de agentes biologicamente ativos, tradicionalmente empregados ou observados pelo homem (HOLMSTEDT & BRUHN, 1983).

Em nossos estudo, a abordagem adotada para a escolha da espécie em questão foi feita através da etnofarmacologia, isto é, a escolha foi apontada como indicações de usos feitas pela própria população, a qual pode fornecer grandes descobertas em termos de princípios ativos e atividades farmacológicas dos mesmos.

No entanto, para que estes estudos com plantas medicinais proporcione resultados relevantes e confiáveis, faz-se necessária uma efetiva interrelação e troca de informações durante as várias fases da pesquisa científica para que não fique restrita a um conglomerado de diferentes profissionais (DI STASI, 1996).

A ação de extratos vegetais sobre a pressão arterial e a função renal é pouco conhecida, entre a diversidade de plantas medicinais, tem sido demonstrado que muitas apresentam atividade diurética, como a flavonona obtida de *Citrus* sp. (GALATI *et al.*, 1996); *Lepidium latifolium* L. (NAVARRO *et al.*, 1994); *Scriophularia frutescens* L. (FERNANDEZ *et al.*, 1994); *Bredemeyera floribunda* Willd (BEVEVINO *et al.*, 1994); *Cecropia obtusifolia* (HOWELL & MONTERO, 1996); *Eugenia uniflora* (AMAT, BATTISTA, ULIANA, 1997); *Allium sativum* (CRUZ, CUNHA, CASTRO-CHAVES, 1999); *Alternanthera pungens* (CALDERON *et al.*, 1999); *Commelina platyphylla* (BASUALDO, ZARDINE, ORTIZ, 1991; ALLIOTA *et al.*, 1994). Equanto outras apresentam a capacidade de solubilização de cálculos renais, debelar depósitos de ácido úrico, cistites, e tratar retenção e incontinência urinária (MATTOS & DA GRAÇAS, 1980; VAN DEN BERG, 1980; ALLIOTA *et al.*, 1994), ainda com propriedades hipotensoras (HIGASHINO *et al.*, 1992).

Uma das espécies apontadas com importância medicinal é a *Vernonia polyanthes* Less. (GEMTCHÚJNICOV, 1976; SCATENA, 1983), pertencente ao gênero *Vernonia*, à família Asteraceae ou Compositae (SILVA, FRANCO, CONEGERO, 1995), a qual apesar de ser bastante numeroso e disseminado no Brasil vegetando no Centro-Oeste, Sul e Sudeste do país indo até a Bahia (CAMPOS, 1994), apenas 10% de suas espécies foram estudadas química e/ou farmacologicamente (ALMEIDA, 1993).

Recentemente, tem sido demonstrada outras propriedades medicinais da *Vernonia*. O gênero *Vernonia* sp. é utilizado para tratamento da cistite (COSTA-NETO & OLIVEIRA, 2000). A *Vernonia condensata* Baker é eficaz para problemas estomacais, digestivos, (FRUTUOSO *et al.*, 1994; COSTA-NETO & OLIVEIRA, 2000) e a *Vernonia scorpioides* possui atividade analgésica (FRUTUOSO *et al.*, 1994); enquanto KASONIA, (1995) verificou um efeito miorelaxante da *Vernonia amigdalina*, a *Vernonia cinerea* Less. possui também atividade diurética e antidiurética (ADEBOYE, ASIJE, AWE, 1997), a *Vernonia glabra* possui atividade miorelaxante reduzindo as pressões arteriais média, sistólica e diastólica (ACHOLA *et al.*, 1996).

A *Vernonia polyanthes* Less conhecida popularmente como assa-peixe, apresentando também sinônimos como cambará-branco e cambará-guaçu (CAMPOS, 1994) é descrita como planta medicinal (PENA, 1946). Essa planta é um arbusto que mede até 3m de altura (CAMPOS, 1995), apresenta folhas lanceoladas e ásperas com cerca de 15 cm de comprimento e nervuras duplamente proeminentes, sendo mais proeminentes na face inferior (dorsal), que também apresentam-se mais fortemente pilosas em relação à face superior (ventral). Ela apresenta também elementos histológicos característicos como: grandes tricomas tectores pluricelulares (cerca de 1mm de comprimento), drusas e tubos de látex (JORGE, PEREIRA, SILVA, 1991).

O assa-peixe tem por característica ser uma planta ramificada, a qual apresenta flores pequenas reunidas em inflorescências no ápice dos ramos, em cachos, sendo de cor branca ou lilás clara, muito aromáticas (CAMPOS, 1994). A arquitetura e o desenvolvimento da *Vernonia polyanthes*, como uma ramificação lateral intensiva, podem sofrer alterações significantes quando na presença de parasitas naturais como alguns insetos (SILVA *et al.*, 1996), causando redução na produção das flores e diminuição da viabilidade das sementes.

Com a presença de alguns parasitas ocorre a formação das chamadas galhas na planta hospedeira, no caso a *Vernonia polyanthes*, frente à essas estruturas ocorre um aumento na produção de substância fenólica por parte da planta, próxima ao local que encontram-se as larvas dos insetos, que pode significar um mecanismo de defesa da mesma contra o inseto galhador (ANDRADE *et al.*, 1995).

Ela floresce durante os meses de janeiro a abril, produzindo grande quantidade de sementes que são facilmente carregadas pelo vento, tornando-se portanto o meio de reprodução dessa espécie (CAMPOS, 1994), sua capacidade de reprodução é enorme e pouco exigente com relação às condições do solo, também é muito resistente às temperaturas variáveis e à intensidade de luz (MALUF, 1993). Essa grande capacidade de reprodução torna-se visível quando algumas leguminosas forrageiras com potencial alelopático são introduzidas nos locais de reprodução da *Vernonia polyanthes* e observa-se que há interferência discreta no crescimento e na reprodução da espécie, demonstrando a pequena sensibilidade aos efeitos dessas leguminosas.

Essas descobertas mostram a capacidade que o assa-peixe tem de vegetar entre espécies com potencial alelopático (SOUZA, RODRIGUES, RODRIGUES, 1997), que consiste de um mecanismo através do qual, determinadas plantas interferem no desenvolvimento de outras, alterando-lhes o padrão e a densidade, esse fenômeno ocorre largamente em comunidades de plantas. Por isso, é uma planta daninha mais frequente e temida das nossas pastagens (KISSMAN & GROTH, 1992). Por esse aspecto negativo, pesquisadores têm procurado desenvolver herbicidas que impedem seu desenvolvimento nesses locais (RASSINI & COELHO, 1994).

Faz-se necessário salientar características constitutivas diversas desta planta, uma vez que na época da florada experimentos realizados com assa-peixe não reproduziram os mesmos resultados quando comparados àqueles obtidos com plantas coletadas no período de não florescência (Dados obtidos no Laboratório de Fisiologia da Universidade Estadual Paulista UNESP- Botucatu, não publicados). Esses dados nos levam a pensar que os hormônios característicos de inflorescência alteram a atividade biológica da planta, o que também foi postulado pelos botânicos do Campus de Botucatu e por isso, nossos experimentos com a *Vernonia* foram realizados entre os meses de maio a dezembro, isto é, após a floração.

Isso também demonstra que “coletar a parte da planta correta, no estágio certo de desenvolvimento ou época do ano é necessário para (se obter) a concentração máxima de compostos ativos” (DI STASI, 1996), onde um desses será o princípio ativo responsável por determinada atividade biológica ocasionada pela administração do extrato da planta escolhida para estudo.

Geralmente, essa variação ocorre em função do estágio em que se encontra a planta, como na plena floração ou no período que a antecede. Sem o conhecimento de como realizar a colheita e de como proceder após a mesma pode-se perder todo o trabalho anteriormente despendido (REIS & MARIOT, 2000).

As propriedades medicinais mais descritas popularmente do assa-peixe são: balsâmicas, expectorantes e hemostáticas, constituindo-se assim um medicamento eficaz em doenças do aparelho respiratório como gripes, bronquites e asma (SACRAMENTO *et al.*, 1996; BOAVENTURA *et al.*, 1988; ALMEIDA, 1993; CARIBÉ & CAMPOS, 1991).

Outra propriedade importante descrita do assa-peixe é atrair as abelhas através de suas flores, sendo assim uma planta melífera (KISSMAN & GROTH, 1992), produzindo mel de excelente qualidade, sendo que o própolis também é obtido, entre outras espécies, da coleta de pólen das flores da *Vernonia polyanthes* e o mesmo é aplicado na medicina popular, contendo diferentes compostos químicos que variam de acordo com o local de coleta, bem como o período da mesma (PEREIRA *et al.*, 1998).

Entretanto, ela tem sido usada popularmente como diurética (GEMTCHÚJNICOV, 1976) e esse efeito foi confirmado por RIBEIRO *et al.*, 1986, os quais verificaram um aumento significativo no volume urinário, após a administração intravenosa do extrato bruto de *Vernonia polyanthes* em ratas Wistar anestesiadas, também confirmado por SILVEIRA, RUBIO, ALVES (2000) quando o infuso das folhas da *Vernonia polyanthes* foi administrado via oral aos ratos Wistar anestesiados, promovendo efeitos natriurético e hipotensor.

O trabalho de SCATENA, 1983, também mostra evidências positivas sob esse aspecto, quando o extrato aquoso (decocto) de *Vernonia polyanthes* foi administrado via endovenosa em cães anestesiados provocando uma diurese.

A propriedade diurética de uma substância ou mesmo de uma planta, consiste na sua capacidade de aumentar o fluxo urinário; a maioria dos diuréticos também aumenta a excreção urinária dos solutos, especialmente sódio e cloreto. A excreção aumentada de água, na maior parte dos casos, ocorre secundariamente à inibição da reabsorção tubular de sódio, já que o sódio remanescente nos túbulos age osmoticamente para diminuir a reabsorção de água, acarretando assim, natriurese e conseqüentemente diurese (GUYTON & HALL, 1997).

A respeito das propriedades descritas acima e confirmadas por esses trabalhos, em nenhum momento foi citado o princípio ativo responsável pelos efeitos observados frente à administração dessa planta ou ainda, substâncias que possam proporcionar diferentes efeitos em ensaios biológicos.

SCATENA (1983) mostrou em estudo histoquímico de extratos de folhas jovens e também do caule da *Vernonia polyanthes* a presença de constituintes celulares tais como: cristais, açúcares, óleos, ligninas, taninos e outros, mas esses não foram isolados e testados farmacologicamente para poder afirmar se algum deles é o princípio ativo responsável pelo efeito diurético observado.

BOHLMANN *et al.*, 1983, estudaram quimicamente essa espécie e isolaram uma classe de compostos denominados *hirsutinolides*, que correspondem à classe das lignanas, mas não há informações, nesse trabalho, de estudos sobre os efeitos farmacológicos deste composto químico. As lignanas são dímeros obtidos por reações de espécies químicas monoméricas, possuem distribuição universal nas espécies lenhosas e uma variedade imensa de metabólitos, devido às diversas reações entre seus precursores (DI STASI, 1996).

As lignanas desempenham importante papel na defesa das plantas, atuando como agentes antimicrobianos, antifúngicos e insetífugos. Por terem atividade antitumoral e antiviral, elas despertam grande interesse farmacológico (ROBBERS *et al.*, 1998).

Algumas lignanas derivadas de diferentes espécies de plantas desempenham um papel importante como potente inibidor da PAF (fator de ativação plaquetária), são também observadas como inibidoras da degranulação de neutrófilos em humanos, sendo assim, esses compostos podem ser empregados como broncodilatadores, desempenhando atividade anti-asmática (WILLIAMSON, OKPAKO, EVANS, 1997).

Esse composto, *hirsutinolides*, também foi identificado estando presente na espécie *Vernonia cinerea*, juntamente com algumas lactonas (ABDEL-SATTAR, MOSSA, el-ASKARY, 2000). Não se pode afirmar que esse composto seja o princípio ativo que causa a diurese em relação à *Vernonia polyanthes*, apenas com base em testes químicos, pois não há indícios de ensaios biológicos com este composto isolado.

Para a liberação dos compostos químicos de determinadas plantas, possíveis princípios ativos, deve-se levar em conta o método de extração dos mesmos, a escolha apropriada de um método para preparação das plantas é o primeiro passo para a descoberta de novos compostos com atividades farmacológicas.

Existem vários métodos de preparação que podem ser utilizados, um deles é o chá, o qual pode ser obtido por maneiras diferentes de acordo com a composição e a qualidade de cada planta utilizada na prática medicinal. Como exemplos podem ser citados a maceração, infusão, decocção ou tisana (CARIBÉ & CAMPOS, 1991).

A maceração consiste em deixar as plantas (ervas) secas ou frescas submersas em água fria por um período de 12 a 18 horas à temperatura ambiente, em seguida aquecer à baixa temperatura, coar e o chá está pronto. A infusão é realizada com água fervente colocada sobre as plantas deixando repousar por 5 a 10 minutos. A decocção é o método pelo qual as plantas são colocadas num recipiente adequado com água fria e são levados ao fogo brando para cozinhar por 3 a 30 minutos, em seguida deixando em repouso por alguns minutos. A tisana consiste em colocar água fria para ferver e então acrescentar as plantas nessa água tampando o recipiente, deixando ferver por mais 5 minutos e retirar do fogo; após alguns minutos de repouso ele está pronto.

A extração dos composto químicos também pode ser feita através de um solvente. Pode ser realizada através da maceração, filtração, destilação a vapor e pela escolha do solvente (WILLIAMSON *et al.*, 1997). A extração por maceração consiste em submeter a parte escolhida da planta com um solvente adequado, deixando a mistura descansar por algumas horas, para a liberação dos compostos desejados, filtrando e concentrando em seguida o extrato. Esse método apresenta a vantagem de usar o solvente a frio, reduzindo a decomposição do material vegetal, mas torna-se necessário longo tempo de preparação e grande volume de solvente.

A filtração é um processo similar à maceração mas a planta é submetida a um refluxo com solvente a quente. A metodologia utilizada nesse caso é rápida e usa-se pouco solvente, mas pode ocorrer decomposição do material devido ao aquecimento. A destilação a vapor é realizada pela volatilidade de óleos que são imiscíveis em água. Se os compostos extraídos são solúveis em água o método torna-se menos eficaz devido ao grande volume de extrato aquoso produzido, entretanto, em alguns casos a separação do sistema pode ser utilizada para concentrar o extrato.

Com a escolha do solvente orgânico, as características dos compostos obtidos no extrato são conhecidas, é assim um método seletivo, tornando-se um processo seguro. Outro caminho é iniciar a extração com solvente apolar e continuar com outros de maior polaridade, até que os extratos obtidos tenham aumento da polaridade do soluto. Esses podem ser levados posteriormente para realização de ensaios biológicos.

Para a realização desses ensaios deve-se utilizar métodos apropriados para a avaliação desejada. Em relação à *Vernonia polyanthes* Less. deseja-se avaliar a ação sobre a pressão arterial e especificamente sua ação diurética e natriurética, identificando os sítios de ação do princípio ativo sobre segmentos do néfron.

O estudo do manuseio tubular de sódio foi realizado através do *clearance* de lítio, utilizado como método indireto não-invasivo da medida da reabsorção de sódio e água pelo túbulo proximal e consequentemente do aporte distal de lítio e água aos segmentos distais do néfron (GARCIA, GONTIJO, FIGUEIREDO, 1991).

O *clearance* de lítio foi desenvolvido por volta de 1960, após a introdução deste íon no tratamento de pacientes psiquiátricos. Criando-se portanto a necessidade de estabelecer mecanismos de eliminação do lítio do organismo em casos de intoxicação pelo mesmo (THOMSEN & SHIRLEY, 1997).

Para que o lítio seja um marcador adequado dos fluxos de água e sódio através do néfron, algumas condições são mandatórias: 1º o lítio deve ser livremente filtrado nos glomérulos; 2º a reabsorção do lítio no túbulo proximal deve ser proporcional à reabsorção de água e sódio; 3º o lítio não pode ser reabsorvido nem secretado nos segmentos do nefron distais ao túbulo proximal e 4º o lítio não deve modificar a função renal. Essas possibilidades se completam baseadas inicialmente no fato de que não há, praticamente, qualquer controvérsia quanto à livre filtração glomerular de lítio (KOOMANS, 1989).

Existem inúmeros métodos de avaliação do fluxo iônico através dos túbulos renais, entre estes a micropunção e microperfusão, universalmente aceitos como métodos diretos que possibilitaram grande avanço para o conhecimento do transporte trans-tubular de íons. THOMSEN, HOLSTEIN-RATHLOU, LEYSSAC (1981), compararam a reabsorção tubular proximal, através do *clearance* de lítio, da microperfusão e micropunção. Estes concluíram que o *clearance* de lítio é uma técnica simples que determina com exatidão e confiabilidade a função tubular proximal quando comparado à micropunção.

A utilização de um método indireto como o *clearance* de lítio, se constitui de um instrumento importante para estudos funcionais em diversas situações experimentais, pois evita fatores de erros inerentes aos métodos diretos, tais como uso de anestésicos, procedimentos cirúrgicos e perfusão renal com soluções artificiais (GARCIA *et al.*, 1991).

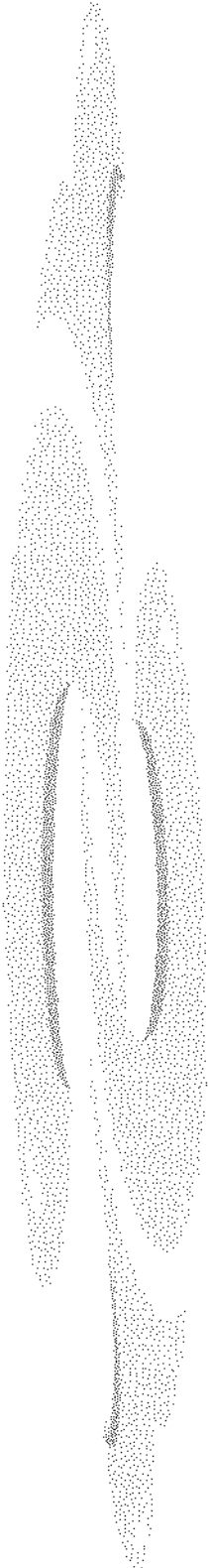
Enquanto os estudos pela micropunção referem-se apenas aos néfrons superficiais isolados, o *clearance* de lítio avalia a população global dos néfrons, incluindo os néfrons superficiais e profundos. Essa diferença pode ocasionar resultados díspares, dada a heterogeneidade funcional desta população, podendo o *clearance* de lítio refletir com mais fidelidade a função renal global. Por outro lado, em seres humanos não é possível a utilização de técnicas como a micropunção ou microperfusão, tornando-se o *clearance* de lítio numa técnica disponível (THOMSEN & SHIRLEY, 1997).

Para o cálculo do *clearance* de lítio, necessita-se conhecer a taxa de filtração glomerular. Esta é estimada através de substâncias que não sejam nem reabsorvidas e nem secretadas pelos túbulos renais. Uma substância que atende à este critério é a inulina, substância exógena encontrada em raízes de plantas, que administrada por via intravenosa estima a filtração glomerular (GUYTON & HALL, 1997).

Devido à inconveniência da administração intravenosa contínua de uma substância exógena, outras substâncias são utilizadas para a determinação desse parâmetro funcional. Dentre as quais a creatinina, presente no plasma numa concentração relativamente constante não requerendo a infusão intravenosa no animal ou paciente, por esta razão, a depuração da creatinina é talvez o método mais amplamente usado para avaliar a filtração glomerular.

Entretanto, devemos ter em mente que a creatinina não é um marcador perfeito da filtração glomerular, uma vez que uma pequena quantidade desta é secretada pelos túbulos, de modo que a quantidade de creatinina excretada na urina excede ligeiramente a quantidade filtrada. Por outro lado, há normalmente um pequeno erro na medida de creatinina plasmática que leva a uma superestimativa da concentração plasmática desta substância, sendo que fortuitamente estes dois erros tendem a cancelar um ao outro (GUYTON & HALL, 1997).

Com o método de *clearance* de lítio podemos identificar a presença de possíveis modificações da diurese ou natriurese sob determinadas situações experimentais, tais como a presente utilizada para avaliar a influência do extrato bruto de *Vernonia polyanthes* Less. sobre a função glomérulo-tubular.



2. OBJETIVOS

Face às observações fundamentadas acima com respeito a possíveis ações farmacológicas do extrato da *Vernonia polyanthes* Less., o presente trabalho teve como objetivos:

- Avaliar o efeito do extrato bruto da *Vernonia polyanthes* Less. sobre a função renal após 7 dias de tratamento através do *clearances* de lítio e creatinina.
- Avaliar o efeito do extrato bruto sobre a pressão arterial caudal.
- Estudar o efeito crônico do extrato bruto, após 14 dias de tratamento sobre a função renal em gaiolas metabólicas.
- Estudar o efeito crônico do extrato sobre a pressão arterial sistólica.
- Definir qualitativamente possíveis classes de compostos de planta com potencial e ação farmacológica sobre a pressão arterial e função renal.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. COLETA DO MATERIAL VEGETAL.

Para a preparação do extrato bruto de *Vernonia polyanthes* Less (assa-peixe) eram utilizadas as folhas desse arbusto, coletadas no jardim Botânico do Campus da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Unesp - Botucatu). Estas foram identificadas pelo botânico Prof. Dr. Ayrton Amaral Júnior do Departamento de Botânica, Unesp, Botucatu.

3.2. EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO VEGETAL DE *VERNONIA POLYANTHES* LESS.

Folhas de *Vernonia polyanthes* Less. (Figura A) foram coletadas entre os meses de maio a dezembro, após o período de florescência da planta (janeiro a abril), embaladas e levadas no mesmo dia para o Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrônômicas (CPQBA - Unicamp, SP).

Em seguida, as folhas foram colocadas por três dias em estufa de dessecação (Fabbe, modelo 170 a 40°C). O material dessecado foi moído em triturador de facas (Stephen, modelo UM 40) e colocado em tanque de aço inoxidável, com agitador mecânico onde as folhas eram imersas em solução de etanol 70% (CHEMCO) sob agitação contínua por 2 horas à temperatura ambiente, obtendo-se assim o extrato bruto a frio (A-I).

Em seguida, procedeu-se a reextração com etanol 70% por mais duas vezes obtendo-se os extratos B-I e C-I. Os extratos A-I, B-I e C-I foram reunidos, filtrados em funil de porcelana com papel de filtro em kitassato sob vácuo, evaporados em rotavapor (BUCHI, modelo E. L.) para a eliminação total do solvente orgânico, fornecendo dessa maneira, o extrato bruto a frio em sua composição final.

O material residual após esta foi colocado em balão de fundo redondo imerso em etanol 70% e submetido a um sistema de refluxo por 1,5 hora por três períodos consecutivos. O extrato obtido foi reunido evaporado em rotavapor a vácuo para extração do solvente orgânico fornecendo o extrato bruto a quente indireto (EBA).

Outra porção do material seco dessa planta foi submetido diretamente à extração a quente (sem passar pela etapa da extração a frio) material foi colocado em balão de fundo redondo imerso em etanol 70% e submetido a um sistema de refluxo por 1,5 hora; por três períodos consecutivos. O extrato obtido foi reunido evaporado em rotavapor a vácuo para extração do solvente orgânico fornecendo o extrato bruto a quente total (EBAT) (Figura B).

Com isso foi realizada a análise fitoquímica, de amostras do extratos resultantes. O EBA após a evaporação para a extração do solvente orgânico foi resuspenso com 3 porções de éter etílico, resultando em duas frações: uma orgânica, menos polar, e outra aquosa com componentes de maior polaridade.

A fração aquosa foi liofilizada, em seguida tomou-se 2g desta diluídas em 100ml de etanol total para as análises fitoquímicas.



Figura A

3.3. TRIAGEM FITOQUÍMICA QUALITATIVA.

A triagem fitoquímica permite excluir ou confirmar classes de compostos orgânicos existentes no extrato bruto de *Vernonia polyanthes* Less.

Os reagentes para a triagem fitoquímica foram preparados segundo (IOEN, 1982).

3.3.1. Soluções utilizadas.

Solução de Liebermann Burchard= 1 ml de Anidrido Acético (MERCK CO) e 3 a 4 gotas de Ácido Sulfúrico concentrado.

Solução de Mayer= Dissolver 1,35 g de Cloreto de Mercúrio (MERCK CO) em 60 ml de água destilada e 5 g de Iodeto de Potássio em 20 ml de água. Misturar as duas soluções e diluir com água até obter 100 ml de solução.

Solução de Carr-Price= Dissolver 25 g de Cloreto de Estanho em 75 ml de Clorofórmio.

Solução de Fehling= Solução A: dissolver 34,65 g de Sulfeto de Cobre (MERCK CO) em água destilada até o volume de 500 ml.

Solução B: dissolver 173 g de sal de Rochelle (Tartarato de Potássio e Sódio tetrahidratado) e 125 g de Hidróxido de Potássio em água destilada até o volume de 500 ml.

Misturar partes iguais das soluções A e B antes do uso, essa mistura deve ser aquecida em banho-maria por 30 minutos.

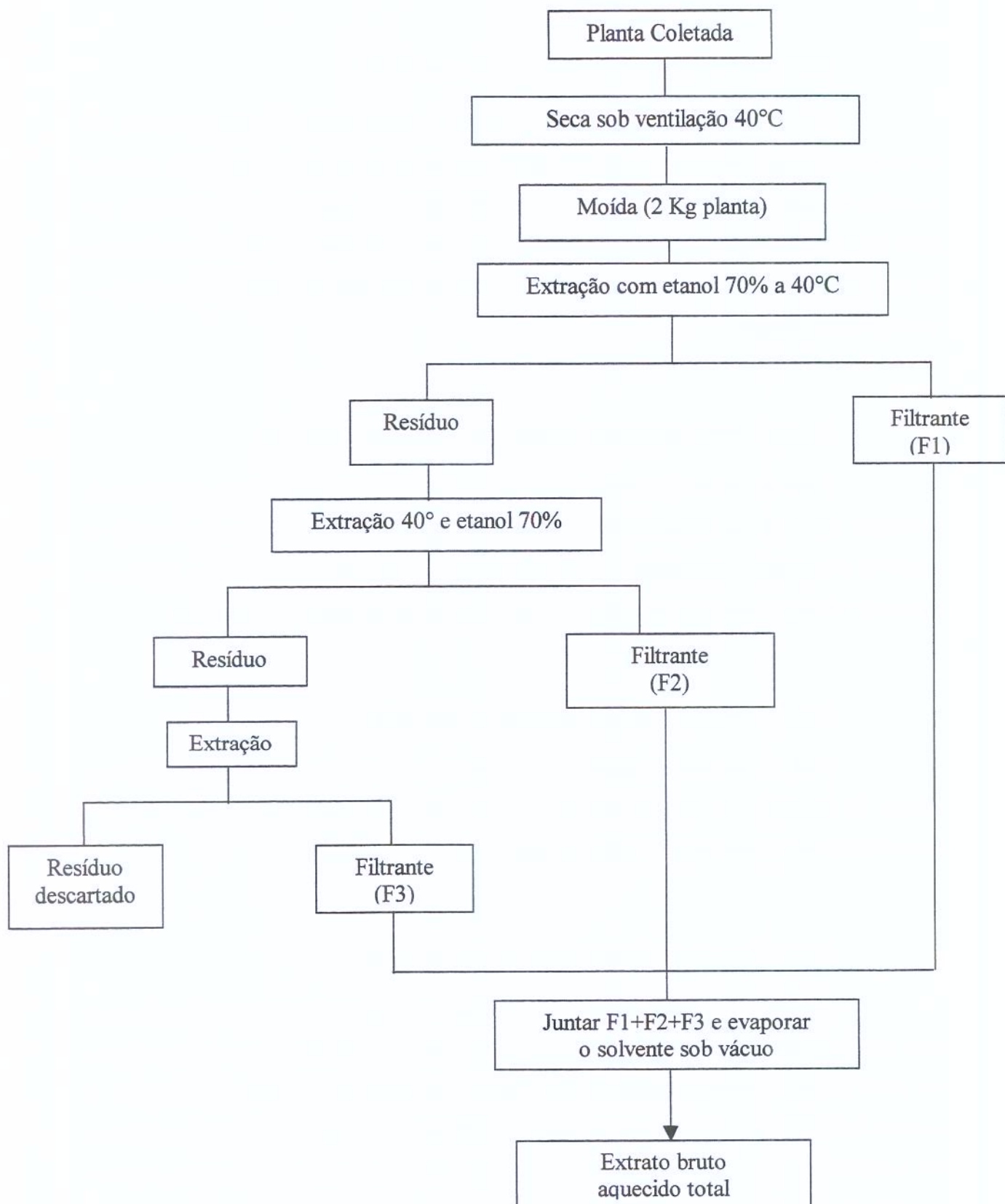


Figura B

3.3.1.1. Ensaio para determinação de alcalóides

Foram utilizados 10 ml de extrato (2g de extrato leofilizado dissolvidos em 100 ml de etanol). Após evaporação em rotavapor, o resíduo resultante foi dissolvido em 3 ml de ácido clorídrico (HCl), dividido em 3 porções iguais. À primeira foi adicionada três gotas de reagente Mayer; a segunda usava-se como branco e à terceira adicionava três gotas de uma solução de ácido silicotúngstico 5%. A formação de um precipitado branco indica a presença de alcalóides.

3.3.1.2. Ensaio para determinação de agliconas flavônicas

5 ml de extrato foram evaporados até secura total. O resíduo resultante foi dissolvido em 2 ml de metanol 50% à quente. À esta solução foi adicionada limalhas de magnésio em pequena quantidade e 1 ml de ácido clorídrico concentrado. Após 10 minutos a presença de uma coloração avermelhada indica a presença de agliconas flavônicas.

3.3.1.3. Ensaio para determinação de emodóis

5 ml de extrato resuspenso e evaporado e o resíduo dissolvido em 1 ml de solução de hidróxido de amônio (MERCK CO) a 25%. Na solução resultante observar o aparecimento de uma coloração vermelha indica a presença de emodóis.

3.3.1.4. Ensaio para determinação de cumarinas

5 ml de extrato resuspenso e evaporado sendo o resíduo dissolvido em 1 ml de água destilada fervendo. Duas alíquotas foram separadas e aplicadas com capilar de vidro em papel de filtro. Sobre o papel de filtro foram aplicados uma solução de hidróxido de potássio (MERCK CO) 0,5 M e as manchas visualizadas em lâmpada ultra-violeta (UV) em um comprimento de onda de 366nm. A presença de fluorescência da mancha indica a presença de cumarinas.

3.3.1.5. Ensaio para determinação de taninos gálicos e catéquicos

Em 5 ml de extrato foram diluídos 2 ml de água destilada. À amostra foram adicionados três a cinco gotas de solução de cloreto férrico a 1%, a mudança de cor da solução para azul indica a presença de taninos gálicos e para verde indica a presença de taninos catéquicos.

3.3.1.6. Ensaio para determinação de saponinas

Em 5 ml de extrato, diluídos em 45 ml de água destilada e após uma agitação vigorosa a observação de espuma durante 20 minutos indica a presença de saponinas.

3.3.1.7. Ensaio para determinação de triterpenos e esteróides

20 ml de extrato evaporados foram dissolvidos em 50 ml de etanol total. Uma alíquota de 40 ml desta preparação foram adicionados 10 ml de hidróxido de potássio 0,5 M e submetida a um sistema de refluxo por duas horas. À amostra resultante foi adicionado 10 ml de água destilada e submetida a evaporação em rotavapor. A amostra resultante foi tratada com 10 ml de éter etílico por três vezes, obtendo-se 30 ml de uma fração orgânica. Alíquota de 5 ml foi submetida à reação de Liebermann-Buchard, onde a formação de um anel verde-azulado e uma interfase marrom sugere a presença de triterpenos e esteróides.

3.3.1.8. Ensaio para determinação de carotenóides

20 ml de extrato foram evaporados e em seguida dissolvidos em 50 ml de etanol total. Uma alíquota de 40 ml foi adicionado 10 ml de hidróxido de potássio 0,5 M e submetido a refluxo por duas horas. À amostra resultante foi adicionado 10 ml de água destilada e evaporado em rotavapor para a extração do álcool. A solução foi em seguida tratada com 10 ml de éter etílico por três vezes, obtendo-se uma fração orgânica. Uma alíquota de 5 ml foi submetida à reação de Carr-Price, onde a formação de um precipitado branco e uma fase sobrenadante azul sugere a presença de carotenóides.

3.3.1.9. Ensaio para determinação de ácidos graxos

20 ml de extrato foram evaporados e dissolvidos em 50 ml de etanol total. Em uma alíquota desta solução de 40 ml foram adicionados 10 ml de hidróxido de potássio 0,5 M e submetida ao refluxo por duas horas. À amostra resultante foi adicionada 10 ml de água destilada e em seguida evaporada para a extração do álcool. Após a evaporação a alíquota foi tratada com 10 ml de éter etílico por três vezes, obtendo-se 30 ml de fração aquosa (alcalina). Esta foi acidificada com ácido clorídrico até pH de 3-4 e submetida a uma reextração com 10 ml de éter etílico por duas vezes e à evaporação total. A formação de resíduos com cristais na parede do tubo de ensaio indica a presença de ácidos graxos.

3.3.1.10. Ensaio para determinação de antracenosídeos

2g de extrato liofilizados dissolvidos em 100 ml de etanol total e concentrado em rotavapor até a redução de volume para 50 ml. A esta solução foram adicionados 10 ml de ácido clorídrico 20% e a preparação submetida a refluxo por 30 minutos. À solução resultante foi adicionada 20 ml de água destilada e promovida a evaporação até um volume de 30 ml. Após a evaporação, 20 ml de éter etílico foram adicionados por três vezes, obtendo-se 60 ml de fração orgânica, após a concentração em rotavapor até o volume de 30 ml. Uma alíquota de 5 ml foi evaporada e o resíduo dissolvido em 3 ml de hidróxido de amônio. O aparecimento de uma coloração vermelha indicou a presença de antracenosídeos.

3.3.1.11. Ensaio para determinação de antocioninas

Para este ensaio foi utilizada a fração aquosa ácida proveniente do ensaio de antracenosídeos e alcalinizada até pH= 9-10. A mudança de coloração para verde-castanho ou azul confirma a presença de antocianinas.

3.3.1.12. Ensaio para determinação de compostos redutores

2g de extrato leofilizado foi dissolvido em 100 ml de etanol total e a solução concentrada em rotavapor até a redução de volume para 30 ml. Desta solução 5 ml foram adicionado a 2 ml de água destilada e a 5 ml de solução de Fehling, submetendo-se a refluxo por 30 minutos. A formação de um precipitado de cor tijolo indica a presença de compostos redutores.

3.4. ANIMAIS

Foram utilizados animais machos Wistar Hannover (300 – 400 g) fornecidos pelo Centro de Bioterismo (Cemib) da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), desmamados com 2 dias. Os animais foram transferidos para biotério do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental (NMCE), mantidos em gaiolas coletivas, recebendo água e ração *ad libitum*.

Os animais após o desmame foram alimentados com ração Nuvilab CR-1 Autoclavável com a seguinte composição:

Umidade (max).....	12,50%
Proteína Bruta (min).....	22,00%
Extrato Etéreo (min).....	3,00%
Matéria Mineral (max).....	10,00%
Matéria Fibrosa (max).....	9,00%
Cálcio (max).....	1,40%
Fósforo (min).....	0,60%

Outros constituintes como vitaminas, microelementos minerais e aminoácidos fazem parte da composição desta ração e eletrólitos como sódio na concentração de $61,3 \pm 9\text{mEq/kg}$ e potássio na concentração de $113 \pm 4\text{mEq/kg}$, dentro de níveis arbitrariamente estabelecidos como normossódica e normopotássica, adequados ao crescimento e reprodução da espécie.

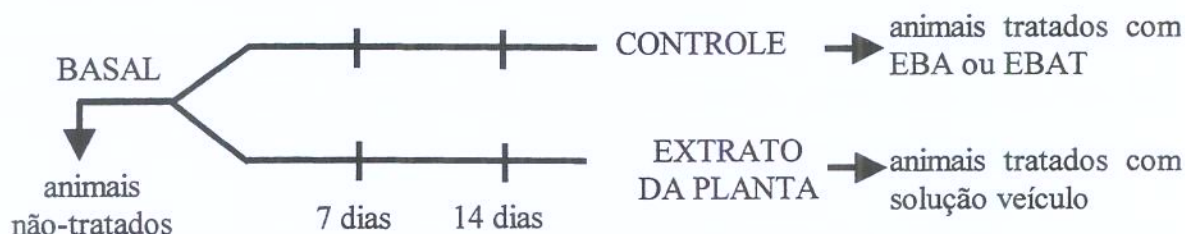
3.5. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Os extratos vegetais de *Vernonia polyanthes* Less. foram testados em desenhos experimentais *in vivo*, em animais vigis e não-restritos, sobre a pressão arterial, função renal glomerular e a manipulação tubular renal de íons estimados pelo *clearance* de creatinina e pelo *clearance* de lítio respectivamente. Os grupos experimentais foram compostos por 10 animais mantidos em gaiolas de plástico individuais recebendo água e ração *ad libitum* por 21 dias de seguimento, onde os pesos da ração ingerida e dos animais foram controladas diariamente.

Durante a primeira semana experimental os animais foram acompanhados diariamente, estabelecendo-se o padrão basal de excreção urinária e de pressão arterial durante uma ingestão livre de ração e água. Para isto, durante esses 7 dias foi realizada uma coleta de urina de 15 horas (1º dia), uma medida de pressão arterial e o estudo da função renal foram aferidas no 5º e 7º dias respectivamente.

Após uma primeira semana de estabelecimento dos parâmetros basais (Grupo Basal), teve início a administração oral de extrato bruto de *Vernonia polyanthes* Less. ou de seu veículo. Os animais foram subdivididos aleatoriamente em dois grupos experimentais de 5 animais que recebiam por gavage uma solução eletrolítica semelhante àquela obtida pela análise dessas substâncias (concentrações de Na^+ e K^+ diluídos em água destilada) no extrato bruto vegetal (Grupo Controle); ou de 5 animais recebendo extrato bruto vegetal, EBA nas doses de 0,5; 1,0 e 1,5 g/kg/peso corporal e EBAT na dose de 1,0 g/kg/peso corporal em diferentes grupos experimentais (Grupo Experimental). Os animais recebiam o extrato da planta e a solução veículo durante 14 dias consecutivos, em duas tomadas, a cada 12 horas.

GRUPOS EXPERIMENTAIS



A composição da solução eletrolítica foi determinada pelo método de fotometria de chama, no EBA foram encontrados 0,8 mEq/L de sódio e 40 mEq/L de potássio. Já no EBAT, obteve-se 1,5 mEq/L de sódio e 135 mEq/L potássio.

3.6. CARACTERIZAÇÃO DO *CLEARANCE* DE LÍTIO.

O estudo da manipulação tubular renal de sódio foi estimada pela técnica do *clearance* de lítio (GARCIA *et al.*, 1991) no decorrer da três semanas experimentais.

O *clearance* de lítio consiste num método de avaliação indireto do fluxo de Na^+ e H_2O transcelular e conseqüentemente da carga de água e sódio que deixam o túbulo proximal em direção ao túbulo distal.

Os animais receberam 0,06 mEq/100g de peso corporal de cloreto de lítio em solução (MERCK) administrado por gavagem 12-14 horas antes do início dos experimentos, em seguida foram colocados em gaiolas individuais de aço inoxidável sem restrição de movimentos, em jejum de ração sólida e ingerindo livremente água.

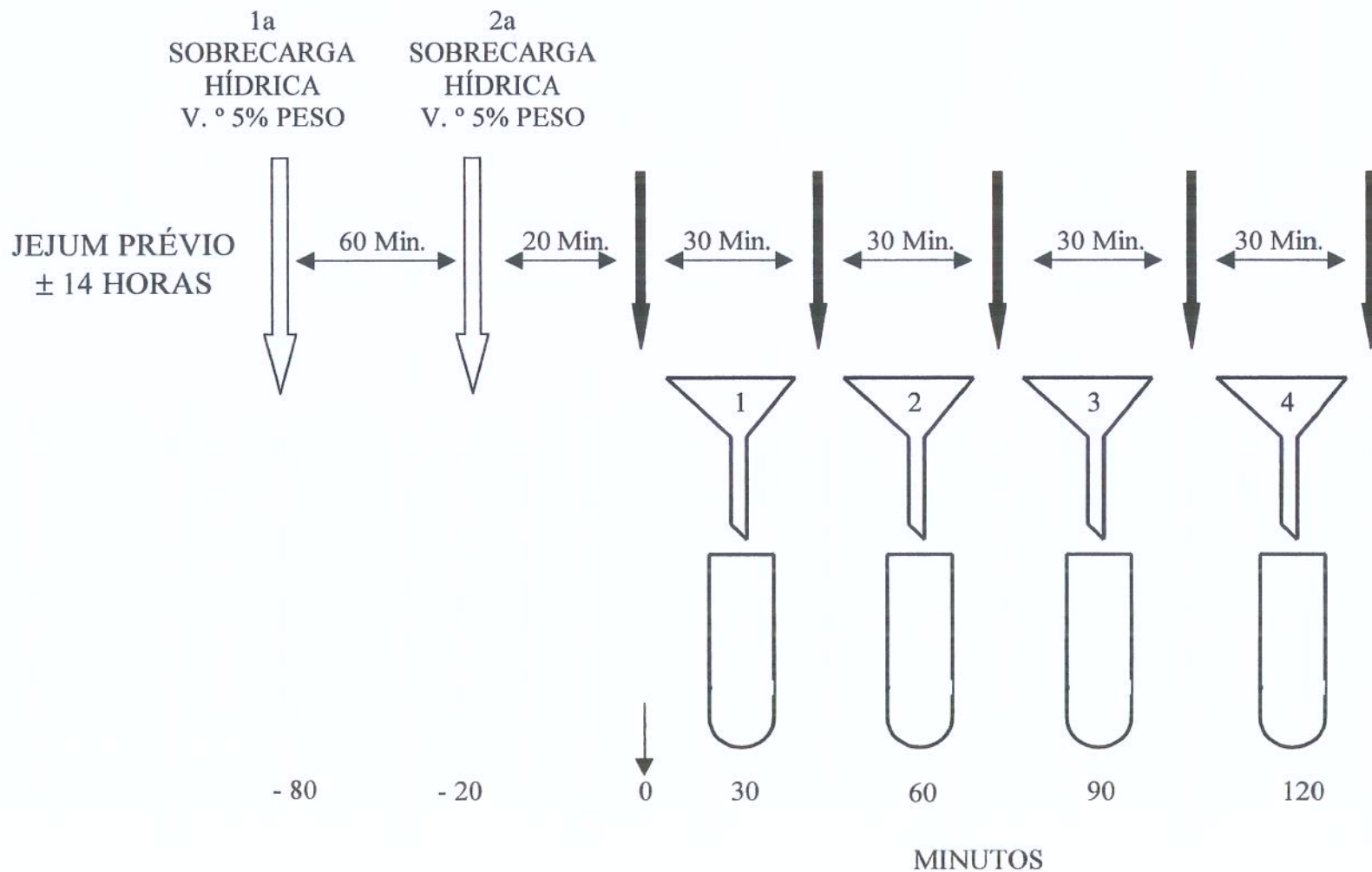
No dia seguinte, para obtenção de fluxo urinário regular e estável, os animais receberam uma carga hídrica de 10% do peso corporal subdividida em duas tomadas, dividida em duas tomadas aos 80 e aos 20 minutos antes do início experimental, sendo em seguida, reconduzidos às gaiolas metabólicas individuais, aí permanecendo por um período de 2 horas em jejum para ração sólida e água.

Após 20 minutos da segunda sobrecarga hídrica, foi iniciada a coleta seriada de alíquotas de urina a cada 30 minutos por 120 minutos, através de funis adequadamente adaptados sob as gaiolas metabólicas que drenavam para tubos cônicos graduados a cada 0,1 ml. Após cada coleta, o volume urinário foi anotado e amostras de urina foram armazenadas em freezer a -20°C (Figura C).

Ao final das coletas de urina, uma amostra de sangue caudal foi obtida na primeira e segunda semanas experimentais. Na última semana, os animais eram anestesiados com éter sulfúrico (CHEMCO) e amostras de sangue foram coletadas através de punção cardíaca. O plasma separado por centrifugação e as amostras de urina foram congeladas (- 20°C) para posteriores dosagens de eletrólitos (Na^+ , K^+ e Li^+) e creatinina (BROD & SIROTA, 1948).

ESQUEMA EXPERIMENTAL

Figura C



3.7. FÓRMULAS E CÁLCULOS UTILIZADOS

3.7.1. *Clearance* de lítio, *clearance* de sódio e *clearance* de creatinina:

$U \times V/P$ em ($\mu\text{l}/\text{min.}/100\text{g}$), sendo U a concentração urinária, V' o volume urinário por minuto e P a concentração plasmática de lítio sódio ou creatinina.

3.7.2. Frações de excreção (FE) de Na, K ou Li:

$FE = CNa/CCr \times 100$ (%), onde o CNa é o *clearance* de sódio e CCr denota o *clearance* de creatinina.

3.7.3. Carga filtrada de sódio (CF):

$CF = PNa \times CCr$ ($\mu\text{Eq}/\text{min.}/100\text{g}$ de peso), onde PNa significa a concentração plasmática de sódio.

3.8. MANUSEIO TUBULAR DE SÓDIO

3.8.1. Aporte distal de sódio (AD):

$AD = PNa \times CLi$ ($\mu\text{Eq}/\text{min.}/100\text{g}$). Representa a carga de sódio que deixa os segmentos próximos dos nefrons em direção aos túbulos distais – (*distal delivery*).

3.8.2. Reabsorção fracional proximal de sódio (RFRP):

$RFRP = ((CF - AD) / CF) \times 100$ (%). Representa a fração da carga filtrada de sódio que foi reabsorvida pelo túbulo proximal.

3.8.3. Reabsorção fracional distal de Na-I (RFRD-I):

$RFRD-I = (AD - (UNa \times V')) / AD \times 100$ (%), sendo UNa a concentração urinária de sódio; representa a fração do AD que foi reabsorvida pelo ND.

3.8.4. Reabsorção fracional distal de Na-II (RFRD-II):

$RFRD-II = (AD - (UNa \times V') / CF) \times 100 (\%)$. Representa a fração da CF que foi reabsorvida pelo ND.

3.8.5. Fração de excreção proximal de sódio

$$FEPNa = CLi^+ / CCr \times 100.$$

3.8.6. Fração de excreção pós-proximal de sódio.

$$FEPPNa = CNa^+ / CLi^+ \times 100.$$

3.9. MEDIDA DA PRESSÃO ARTERIAL

Uma vez por semana foi realizada a medida da pressão arterial caudal (Figura D) de cada animal, em estado vigil, pelo método de pletismografia de cauda (Narco System Co Aistin. Tx) em animais previamente aquecidos (LOVENBERG, 1987).

3.10. PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS

As concentrações de Na^+ , K^+ e Li^+ plasmáticas e urinárias foram determinadas pelo método de fotometria de chama (Micronal, modelo 262, São Paulo- SP). A creatinina plasmática e urinária foram dosadas pelo método colorimétrico do picrato alcalino (BROD & SIROTA, 1948) através de espectrofotômetro Micronal, modelo 382, São Paulo-SP. O *clearance* de creatinina foi utilizado como estimativa da taxa de filtração glomerular, os valores da taxa de filtração glomerular, volume urinário e excreção urinária de sódio foram expressas por 100 gramas de peso corporal.

A proteína urinária de 15 horas foi determinada pelo método do ácido sulfossalísílico.

Pressão Arterial: Método

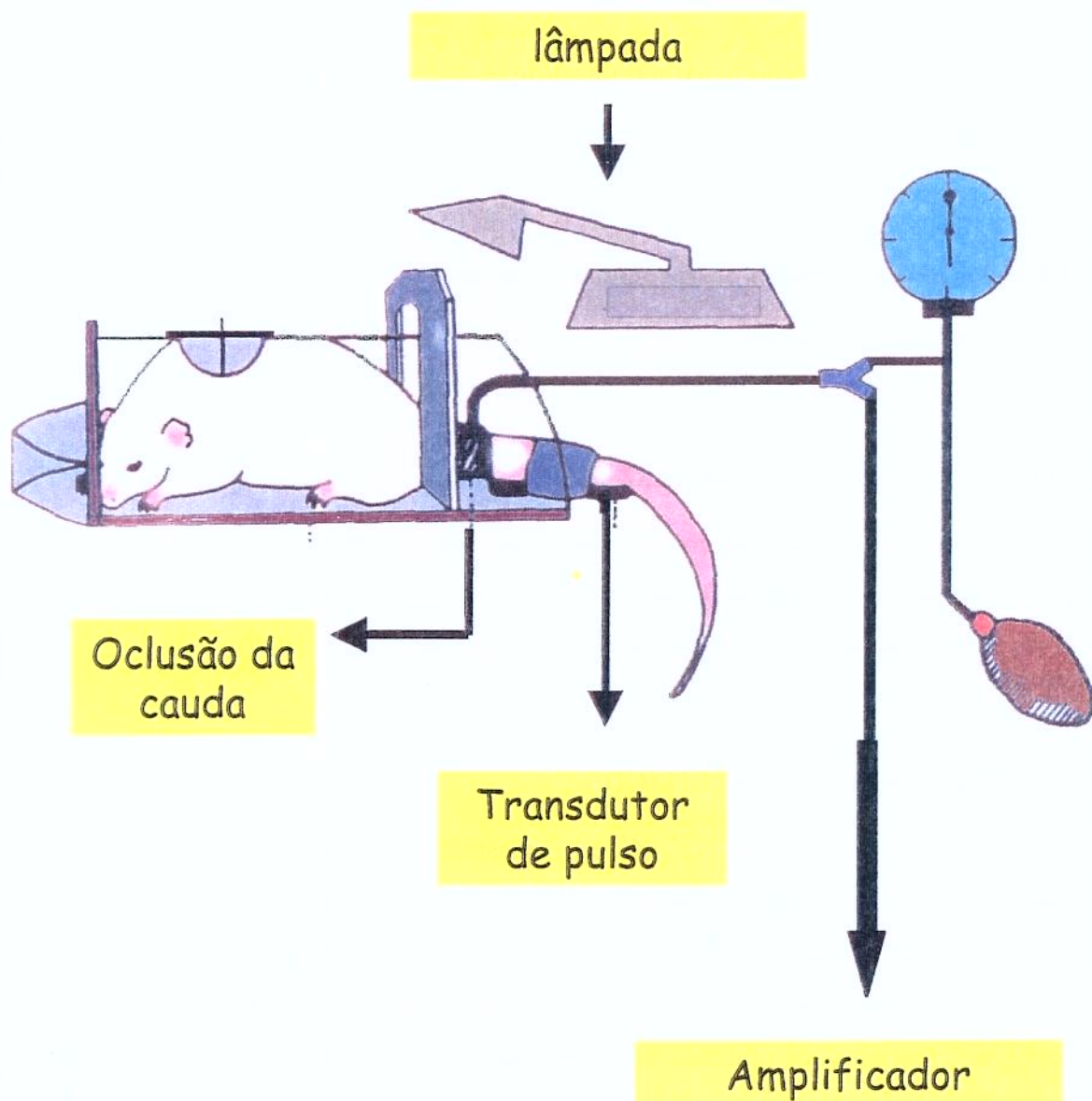


Figura D

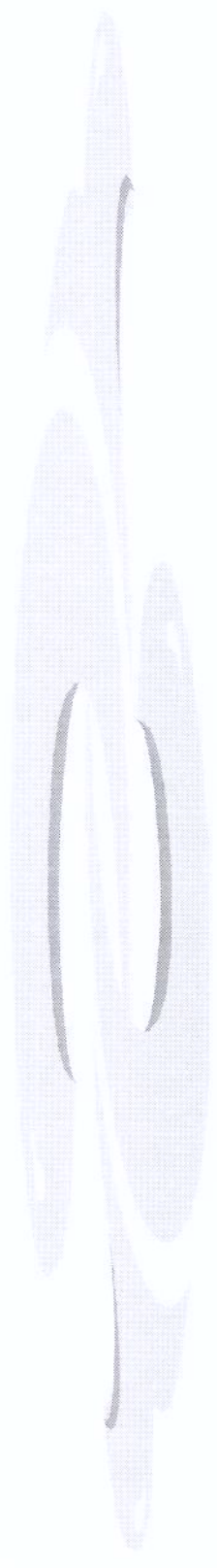
3.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

As comparações estatísticas realizadas entre os grupos experimentais estudados foram avaliadas por análise de variância *one-way* aplicando-se o teste t-student quando pertinente para definir temporalmente os pontos significantes. Os dados foram expressos como média $\pm$ EPM (erro padrão da média), estabelecendo-se como nível de significância estável para $p < 0,05$ (5%).

A área sobre a curva (ASC) foi calculada através da integral dos resultados obtidos no tempo total de 120 minutos, o qual foi realizado pelo programa Sigma Plot versão 1.02. A ASC demonstra claramente o efeito obtido após administração do extrato pelo tempo integral, onde também será mostrado nos períodos de 30', 60', 90' e 120', com isso, os resultados na forma da ASC possibilitam uma visualização global dos efeitos promovidos pela administração do extrato.

3.12. ASPECTOS ÉTICOS

O presente trabalho científico foi regido por normas de condutas estabelecidas no Manual para Técnicos de Biotério para ensaios em animais de experimentação, de Valderez Bastos Valero, editada pela FINEP e EPM, 1990.



4. RESULTADOS

Os resultados são apresentados sob a forma de gráficos e tabelas referentes ao *clearance* de creatinina (CCr), *clearance* de lítio (CLi), *clearance* de sódio (CNa), fração excretada de potássio (FEK), fração excretada de sódio (FENa), fração excretada proximal de sódio (FEPNa), fração excretada pós-proximal de sódio (FEPPNa), volume urinário de 15 horas (VU), carga excretada de potássio (UKV), carga excretada de sódio (UNaV), pressão arterial caudal (PAC), proteinúria (UPrV) e peso corporal diário (PC) após administração diária do veículo (CO) e dos extratos nas doses de 0,5, 1,0 e 1,5 g/kg/peso corporal. Os grupos experimentais foram assim divididos: basal (sem tratamento, apenas recebem água no dia do *clearance*), controle (água destilada + eletrólitos, intitulado de veículo - VEH) e experimental (extrato bruto aquecido ou extrato bruto aquecido total) representados, respectivamente, pelas seguintes abreviações: **BASAL**, **CO** e **EBA** ou **EBAT** respectivamente.

O nível de significância estatística admitida para os resultados analisados em relação ao grupo controle foram de 5% ($p \leq 0,05$); a significância estatística para as análises feitas para os diferentes grupos experimentais foram anotadas como a = CO x EBA ou EBAT, b = BASAL x CO; BASAL x EBA ou BASAL x EBAT.

Os resultados estão representados sob a forma de tempo (30, 60, 90 e 120 min) e também sob a forma de área sobre a curva (ASC), calculando o total obtido no decorrer do período experimental.

4.1. ESTUDO FUNCIONAL RENAL

4.1.1. *Clearance* de Creatinina

As figuras 1, 1' e as tabelas 1, 1' apresentam os valores para o *clearance* de creatinina após administração por gavagem das doses crescentes do EBA (0,5 e 1,0 g/kg/peso corporal) não havendo modificações significativas da filtração glomerular na 1ª semana de tratamento comparados aos grupos basal e controle. A administração oral de EBA na dose de 1,5 g/kg promoveu um decréscimo significativo do CCr aos 90 e 120 min ($P = 0,018$ e $P = 0,039$ respectivamente) em relação ao basal e ao controle. Já na dose de 1,0 g/kg do extrato aquecido total (EBAT) observa-se um aumento significativo do CCr em todos os períodos analisados quando comparado aos demais grupos estudados.

Nas figuras 2, 2' e tabelas 2, 1' vemos os resultados obtidos para o CCr após 2 semanas de tratamento com 0,5, 1,0 e 1,5 g/kg/peso corporal. Como verificado na primeira semana, o tratamento diário com EBA não promoveu modificações significativas na filtração glomerular em ratos acordados. Por outro lado, a administração de 1,0 g/kg de EBAT causa um aumento da filtração glomerular em todos os períodos (30-120 min) sendo este acréscimo, estatisticamente significativo aos 30, 60 e 120 min em relação ao basal.

4.1.2. Clearance de Lítio

As figuras 3, 3' e tabelas 3, 2' apresentam a evolução temporal do CLi após uma semana de tratamento com EBA. A administração oral de 0,5 g/kg promoveu uma elevação significativa do CLi comparado ao grupo basal aos 60 min ($P = 0,015$) e aos 90 min ($P = 0,001$). Apesar da ausência de qualquer modificação do CLi à administração de 1,0 g/kg de EBA, a dose de 1,5 g promove queda a partir de 90 min, sendo estatisticamente significativa aos 90 e 120 min tanto em relação ao basal como controle. Efetuando-se a administração de 1,0 g de EBAT observa-se um aumento significativo e persistente do *clearance* de lítio em relação ao controle.

Após a segunda semana de tratamento (figuras 4, 4' e tabela 4, 2') persistiu um aumento significativo do CLi aos 30 e aos 90 min, após 0,5 g/kg de EBA em relação ao basal, bem como uma queda pronunciada do CLi aos 90 e 120 min após a administração do EBA na dose de 1,5 g/kg em relação ao basal. As doses de 1,0 g/kg de EBA e EBAT não promoveram mudanças significativas no parâmetro analisado.

4.1.3. Clearance de Sódio

As figuras 5, 5' e tabelas 5, 3' não mostram modificações significativas para o CNa, após administração de 0,5 e 1,0 g/kg de EBA e também de 1,0 g/kg de EBAT, comparados aos grupos basal e controle. Enquanto a administração de 1,5 g/kg de EBA causou uma queda do CNa em todos os períodos experimentais, sendo significativa aos 90 min ($P = 0,005$) em relação ao CO.

Após duas semanas de tratamento dos animais (figuras 6, 6' e tabelas 6, 3') observa-se um aumento pronunciado estatisticamente significativo aos 30 min após administração de 0,5 g/kg de EBA. Após administração de 1,0 e 1,5 g/kg de EBA durante duas semanas não observou-se modificações significativas em nenhum desses períodos nos grupos estudados, bem como para a administração de 1,0 g/kg do EBAT.

4.1.4. Fração de Excreção de Potássio

As figuras 7, 7' e tabelas 7, 4' apresentam a FEK durante a primeira semana de administração de EBA e EBAT. A administração de 0,5 e 1,0 g/kg não modificaram significativamente a excreção urinária de potássio durante os 120 min de estudo metabólico. Após administração de 1,5 g/kg EBA observa-se um aumento significativo da FEK aos 30 e 60 min em relação ao grupo basal. Adicionalmente, a administração de 1,0 g/kg de EBAT promoveu um aumento significativo em todos os períodos analisados tanto após a administração do veículo bem como o EBAT, ambos em relação ao basal, embora este efeito tenha sido mais pronunciado e persistente no grupo EBAT.

Após duas semanas de tratamento (figuras 8, 8' e tabelas 8, 4') a administração de 0,5 e 1,0 g/kg de EBA não promoveu mudanças significativas na FEK. Já na dose de 1,5 g/kg, o EBA causou uma queda significativa após os 30 min de tratamento em relação ao CO. Após a administração de 1,0 g/kg de EBAT, como na primeira semana, ocorreu um aumento significativo da FEK nos animais dos grupos CO e EBAT, quando comparados aos animais do grupo basal em todos os períodos analisados.

4.1.5. Fração de Excreção de Sódio

As figuras 9, 9' e tabelas 9, 5' apresentam os resultados relativos à FENa após 0,5 g/kg de EBA, não observamos modificações significativas na FENa, exceto por um aumento notado aos 120 min no grupo controle. Após a administração de 1,0 g/kg de EBA observamos uma queda progressiva e significativa na excreção urinária de sódio, mais

acentuada aos 30 min. A administração de 1,5 g/kg de EBA não apresentou alterações importantes na FENa quando comparados aos grupos basal e controle. A administração por gavagem do EBAT (1,0 g/kg) promoveu uma queda significativa na excreção urinária de sódio aos 60 e 90 min experimentais.

Duas semanas após o tratamento com EBA (figuras 10, 10' e tabelas 10, 5') a administração de 0,5 g/kg promoveu um aumento significativo da FENa após 30 e 60 min em relação ao grupo controle. Não ocorreram mudanças significativas na excreção de sódio após administração de doses 1,0 e 1,5 g/kg de EBA e 1,0 g/kg de EBAT.

4.1.6. Fração Excretada Proximal de Sódio

As figuras 11, 11' e tabelas 11, 6' apresentam os resultados referentes à FEPNa após o tratamento dos animais durante a primeira semana com a dose de 0,5 g/kg de EBA, mostrando um aumento significativo na excreção proximal de sódio à partir 60 min experimentais. A administração de 1,0; 1,5 de EBA e 1,0 g/kg EBAT não promoveram modificações significativas na manipulação, comparados aos grupos basal e controle.

Duas semanas após o início do tratamento contínuo dos animais com EBA, (figuras 12, 12' e tabelas 12, 6') persistiram as alterações funcionais significativas à administração de 0,5 g/kg, sem que houvesse qualquer alteração significativa frente a essa variável para as demais doses utilizadas.

4.1.7. Fração de Excreção Pós-Proximal de Sódio

As figuras 13, 13' e tabelas 13, 7' apresentam os resultados referentes à FEPPNa após o tratamento dos animais com EBA (0,5, 1,0 e 1,5 g/kg), sem qualquer modificação significativa entre os grupos estudados, embora haja uma clara tendência a uma queda na FEPPNa, principalmente após as doses de 0,5 e 1,0 g/kg de EBA. A administração do EBAT (1,0 g/kg) promoveu significativa diminuição da FEPPNa a partir dos 60 min experimentais.

Durante a segunda semana de administração de EBA, 0,5 g/kg, (figuras 14, 14' e tabelas 14, 7') observa-se um aumento significativo, mas transitório da fração de excreção pós-proximal de sódio aos 30 min experimentais. A administração das demais doses de EBA e EBAT não causaram modificações significativas na FEPPNa.

4.2. ESTUDO SEMANAL DA EXCREÇÃO URINÁRIA HIDRO-SALINA E DA PRESSÃO ARTERIAL CAUDAL.

4.2.1. Fluxo Urinário por Minuto (UV)

Na figura e tabela 15 apresentam os resultados referentes ao fluxo urinário por minuto (UV) de amostras de urina coletadas semanalmente durante a administração diária de EB nas diferentes doses e seus controles. Observa-se a ausência de modificações significativas durante todo o período em estudo (2 semanas) para qualquer das doses utilizadas. Para as doses de 1,0 g/kg do EBA e 1,0 g/kg do EBAT, ocorre uma forte tendência à diminuição do fluxo urinário após a 2ª semana de tratamento.

4.2.2. Carga Excretada de Potássio (U_KV)

Na figura e tabela 16 são apresentados os resultados relativos a U_KV onde não foram observadas modificações significativas durante duas semanas de tratamento, com o EBA de 0,5 g/kg. Após a administração do EBA 1,0 e 1,5 g/kg ocorreu uma significativa queda ($P = 0,040$ e $P = 0,045$) na U_KV após a primeira semana de tratamento em relação aos animais tratados com o veículo (CO) retornando a valores próximos aos basais após a 2ª semana. Ao contrário, a administração oral de 1,0 g/kg de EBAT causa um aumento significativo na excreção de potássio durante a 1ª e 2ª semanas de tratamento, quando comparados aos valores basais.

4.2.3. Carga Excretada de Sódio ($U_{Na}V$)

A administração por gavagem de EBA 0,5 g/kg não promoveu modificações significativas na $U_{Na}V$ em ratos (figura e tabela 17), durante as 2 semanas de tratamento. Na dose de 1,0 g/kg de EBA observou-se uma queda significativa da $U_{Na}V$ em relação aos valores basais após a primeira semana de tratamento, com posterior retorno da excreção de sódio a valores próximos à excreção basal na 2ª semana. Por outro lado, a administração de 1,5 g/kg de EBA causou um aumento progressivo e significativo da $U_{Na}V$ após a segunda semana de tratamento, o mesmo foi observado após administração de 1,0 g/kg do EBAT após as duas semanas de tratamento em relação ao basal.

4.2.4. Proteinúria

A figura e tabela 18 apresentam os resultados referentes à proteinúria observado após a administração de doses crescentes do EB de *Vernonia polyanthes* Less. Observamos que a administração do EB ou veículo promoveu uma queda significativa e progressiva da proteinúria após as duas semanas de tratamento em relação aos valores basais, cuja significância estatística foi dose-dependente ocorrendo já na 1ª ou na 2ª semana.

4.2.5. Pressão Arterial Caudal (PAC)

Na figura e tabela 19 apresentamos as modificações semanais de PAC após administração de EB em doses crescentes. A administração de 0,5 g/kg do EBA promoveu uma queda transitória, mas significativa da PAC na primeira semana de acompanhamento. Após a administração de 1,0 g/kg de EBA ou EBAT observamos uma queda significativa e persistente da pressão arterial caudal em relação aos valores basais e àqueles obtidos após administração do veículo durante as 2 semanas de tratamento. A administração de 1,5 g/kg de EBA não promoveu mudanças significativas sobre a pressão arterial caudal.

4.2.6. Peso Corporal Diário

A figura 20 e tabelas 20, 20' apresentam os resultados da variação diária ponderal dos animais durante o período basal e após a administração de veículo (CO), EBA e EBAT nas doses de 0,5; 1,0; 1,5 e 1,0 g/kg/peso corporal. Os resultados mostram que o extrato bruto de *Vernonia polyanthes* Less. administrado aos animais não modificou o peso corporal em nenhum momento do estudo.

4.3. RESULTADO DA TRIAGEM FITOQUÍMICA

Abaixo, apresentamos a tabela com resultados qualitativos fitoquímicos do extrato de *Vernonia polyanthes* Less. utilizado nos experimentos.

Item de Determinação	Característica Amostral	Resultado
1 – Alcalóides	Ausência de precipitado	Negativo
2 – Agliconas Flavônicas	Cor avermelhada	Positivo
3 – Emodóis	Sem mudança de cor	Negativo
4 – Cumarinas	Presença de halo fluorescente	Positivo
5 – Taninos Gálicos e Catéquicos	Cor azul e em seguida verde	Positivo
6 – Saponinas	Formação de espuma	Positivo
7 – Triterpenos e Esteróides	Ausência de anel colorido	Negativo
8 – Carotenóides	Formação de precipitado	Positivo
9 – Ácidos Graxos	Formação de resíduos com cristais	Positivo
10 – Antracenosídeos	Cor vermelha	Positivo
11 – Antocioninas	Cor azul	Positivo
12 – Compostos Redutores	Ausência de precipitado	Negativo

CCr ($\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}$)

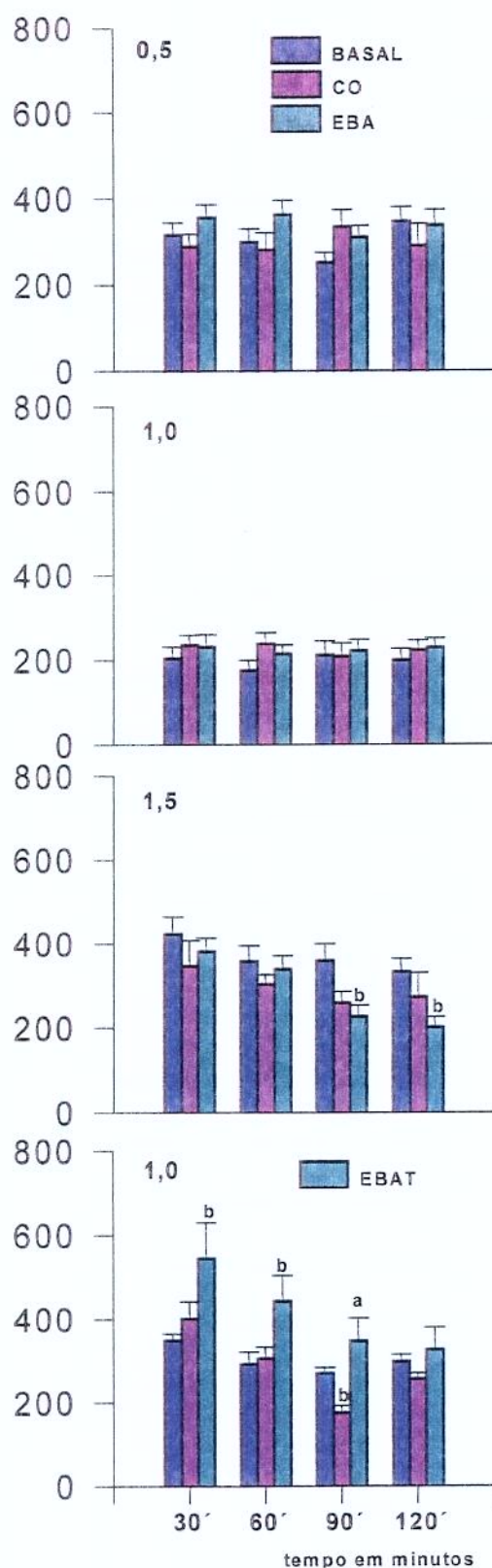


Figura 1: Estudo da filtração glomerular através do *clearance* de creatinina após a 1^a semana de tratamento com água, veículo e EBA nas doses de 0,5; 1,0 e 1,5 g/kg/peso e 1,0 g/kg/peso do EBAT.

ASC - CCr (μl/min/100g)

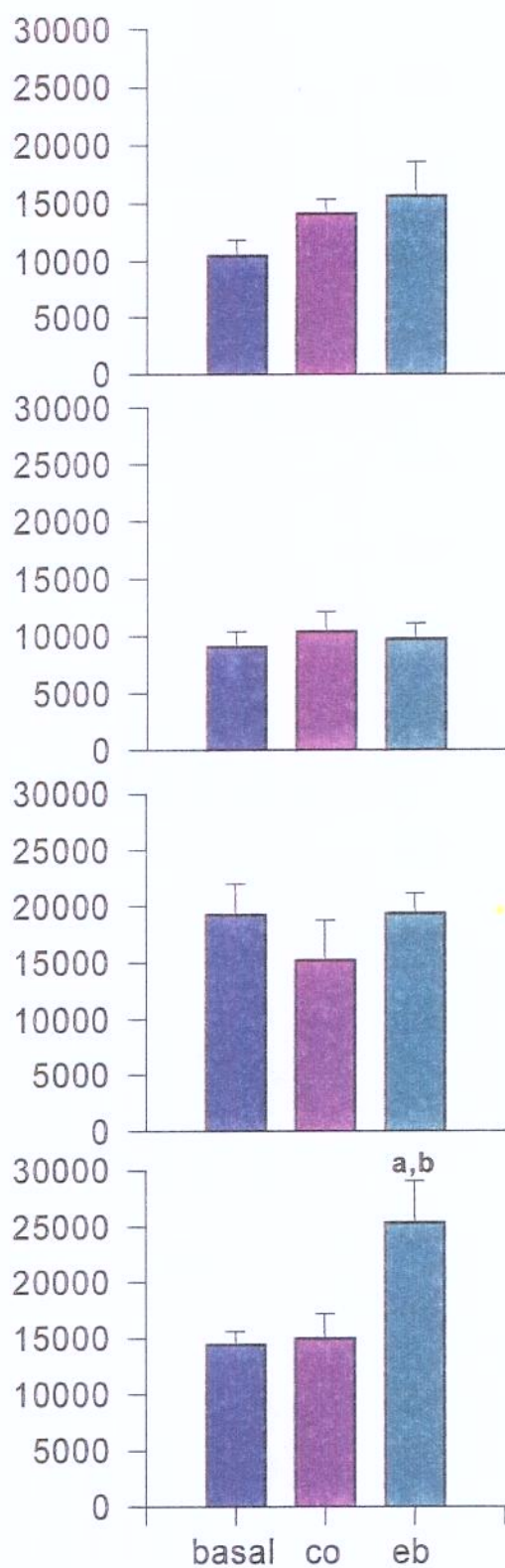


Figura 1': Área sobre a curva correspondente ao *clearance* de creatinina após 1^a semana de tratamento.

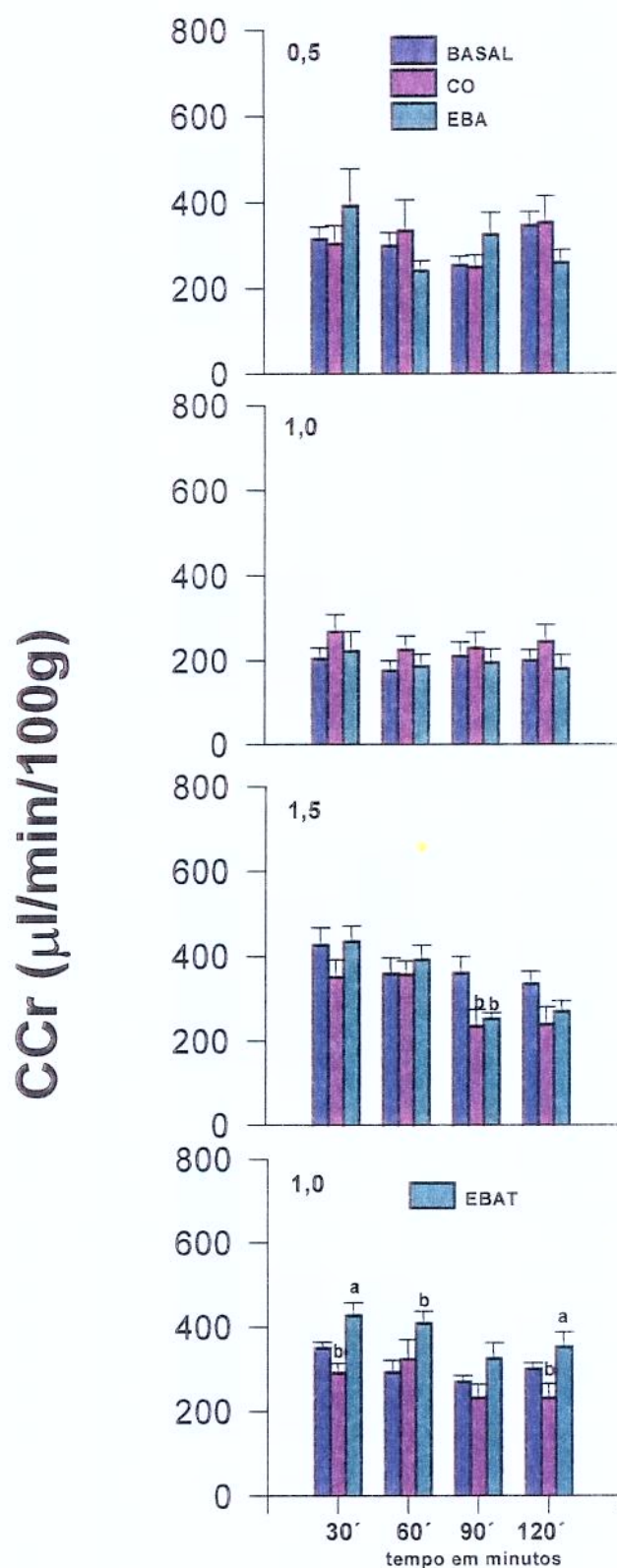


Figura 2: Estudo da filtração glomerular através do *clearance* de creatinina após 2ª semana de tratamento com água, veículo e EBA nas doses de 0,5; 1,0 e 1,5 g/kg/peso e 1,0 g/kg/peso de EBAT.

ASC - CCr ($\mu\text{L}/\text{min}/100\text{g}$)

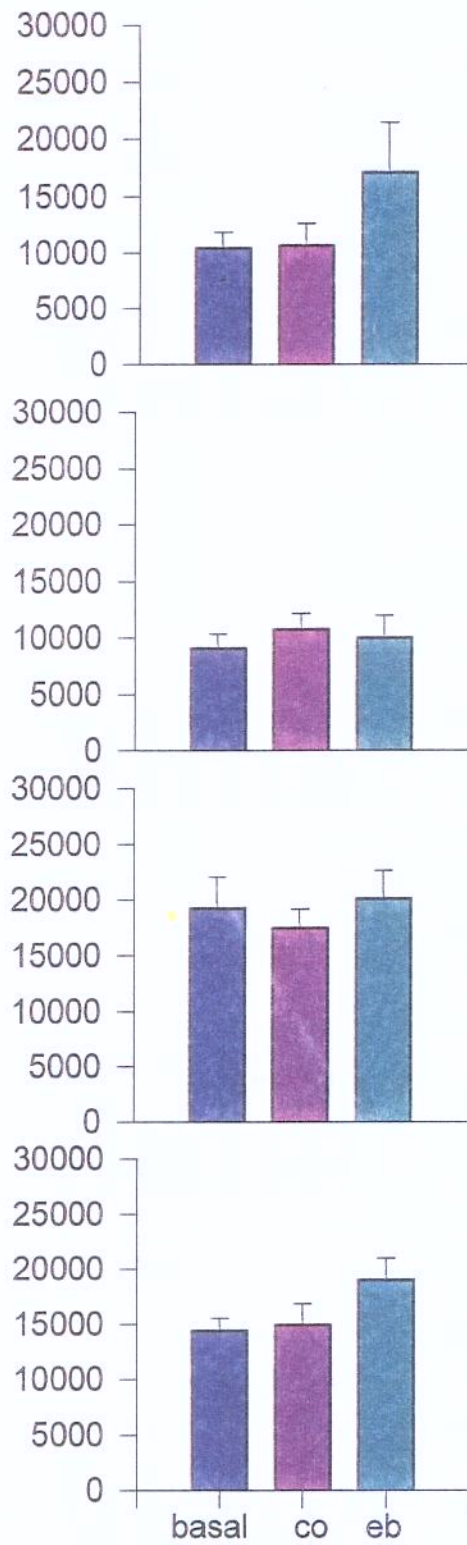


Figura 2': Área sobre a curva correspondente ao *clearance* de creatinina após 2ª semana de tratamento.

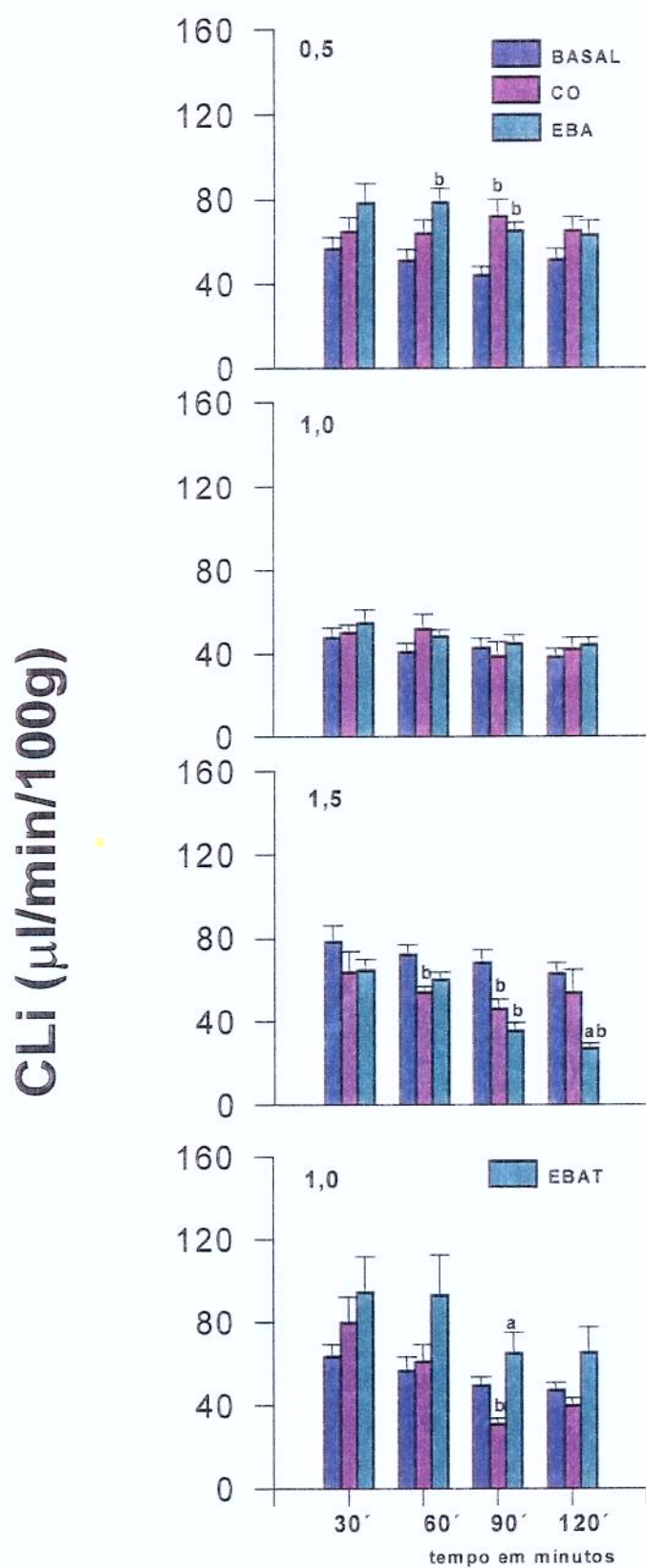


Figura 3: Estudo da *clearance* de lítio após 1^a semana de tratamento com água, veículo e EBA nas doses de 0,5; 1,0 e 1,5 g/kg/peso e 1,0 g/kg/peso de EBAT.

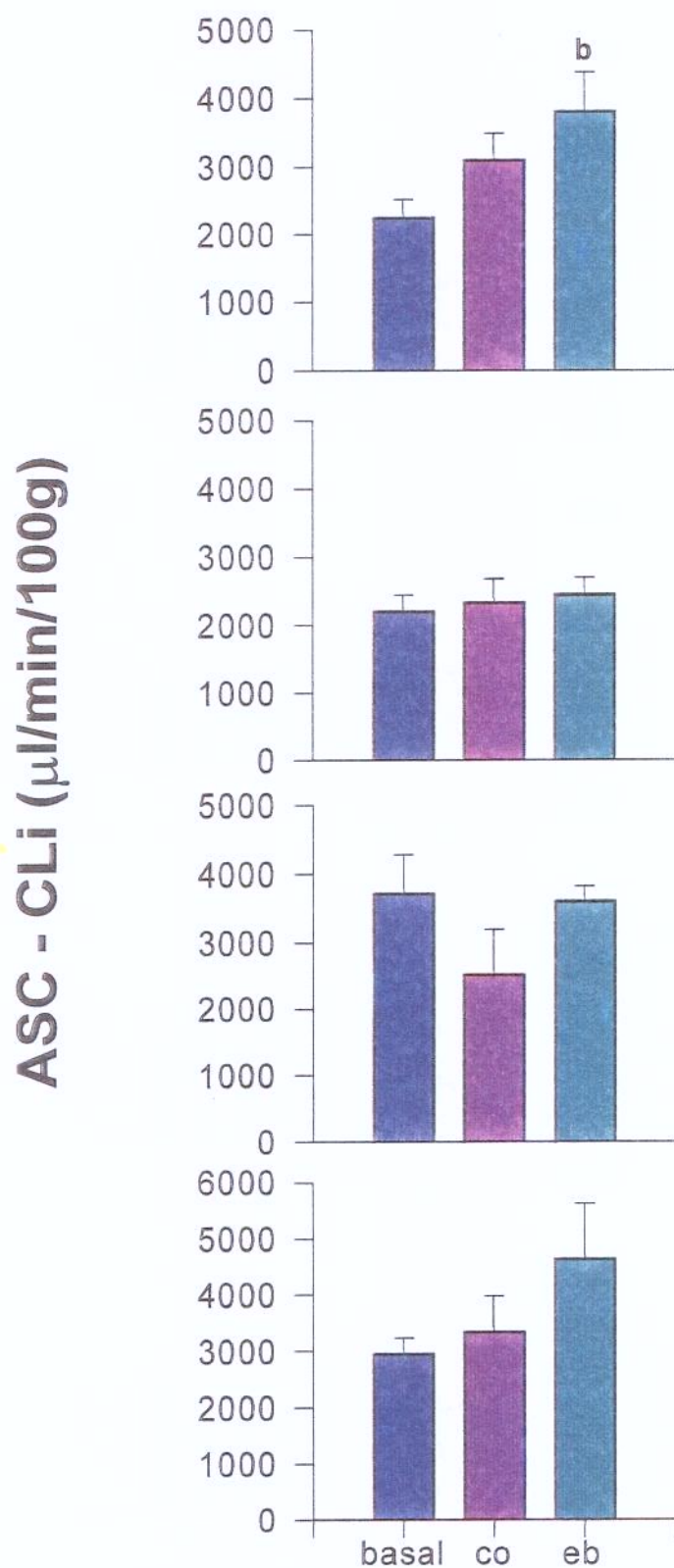


Figura 3': Área sobre a curva correspondente ao *clearance* de lítio após 1^a semana de tratamento.

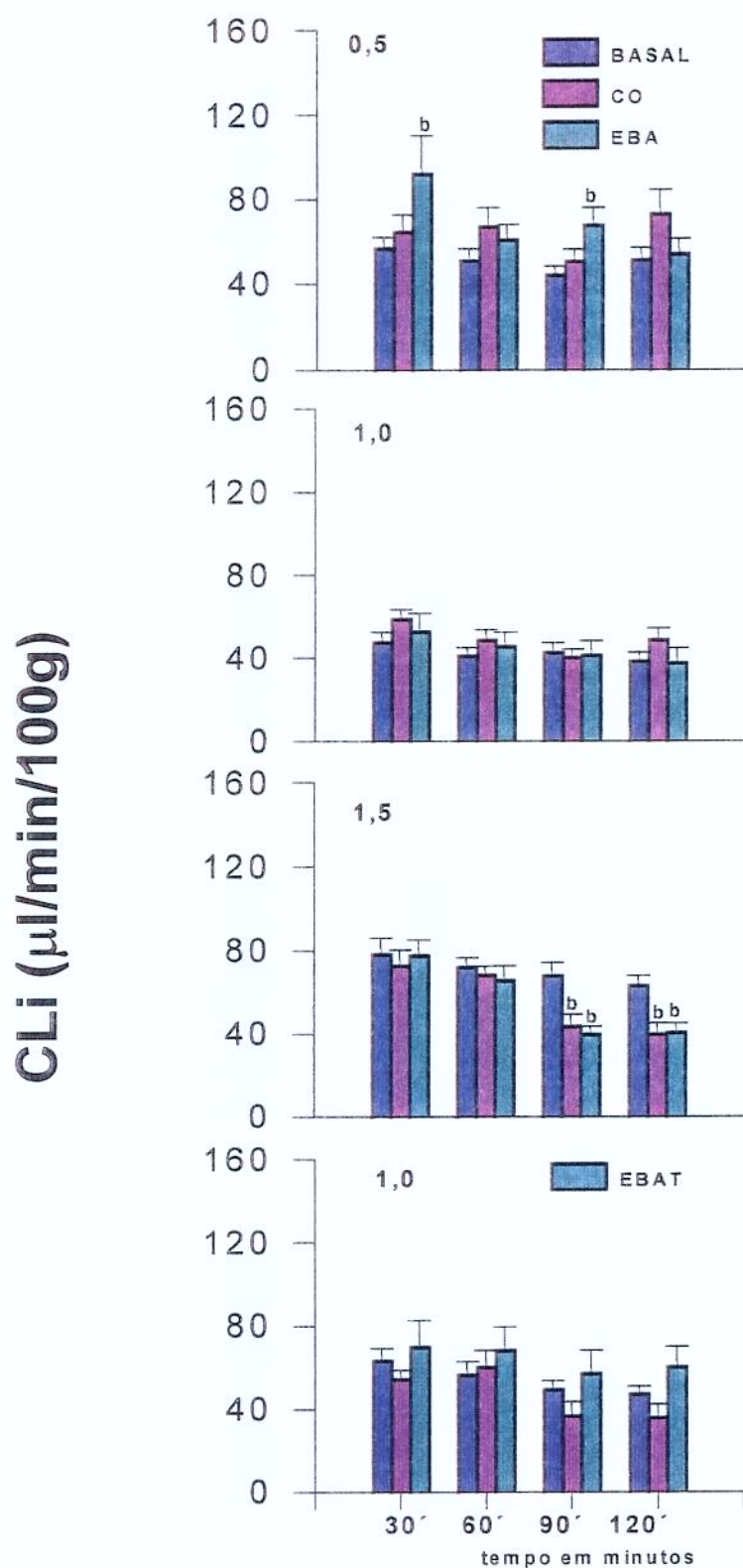


Figura 4: Estudo da *clearance* de lítio após 2^a semana de tratamento com água, veículo e EBA nas doses de 0,5; 1,0 e 1,5 g/kg/peso e 1,0 g/kg/peso de EBAT.

ASC - CLi ($\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}$)

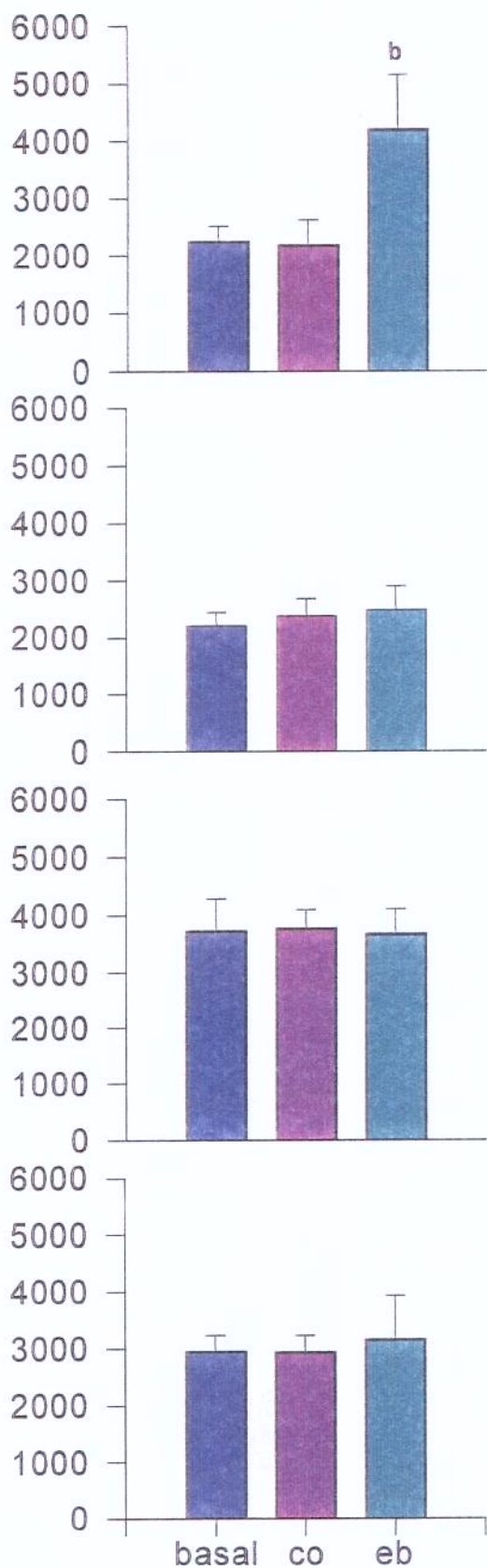


Figura 4': Área sobre a curva correspondente ao *clearance* de lítio após 2^a semana de tratamento.

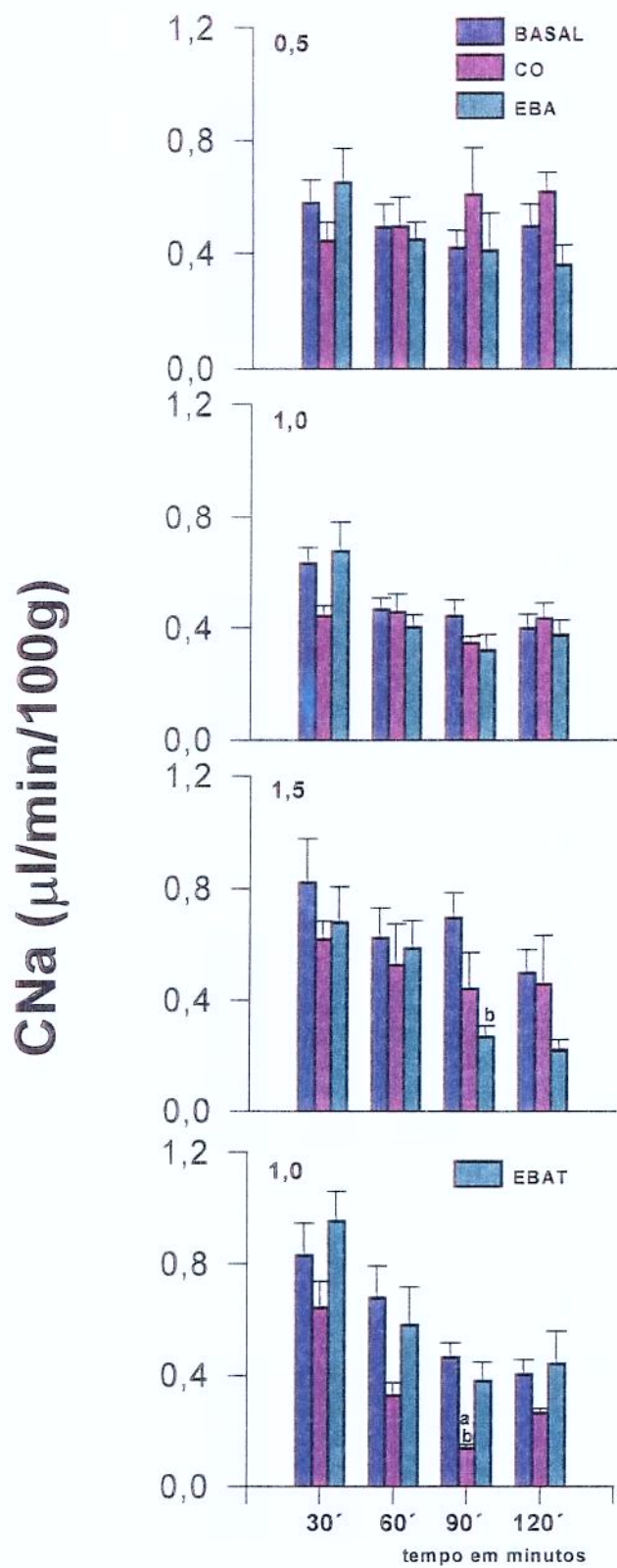


Figura 5: Clearance de sódio após a 1ª semana de tratamento dos animais com água, veículo e EBA nas doses de 0,5; 1,0 e 1,5 g/kg/peso e 1,0 g/kg/peso de EBAT.

ASC - CNa ($\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}$)

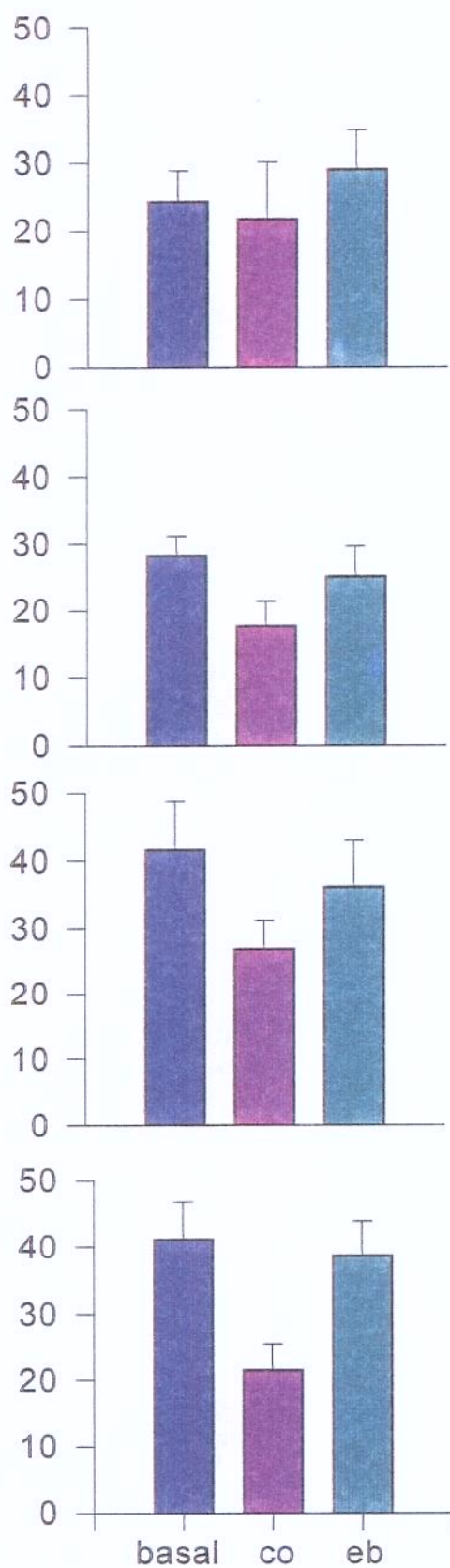


Figura 5': Área sobre a curva correspondente ao *clearance* de sódio após 1ª semana de tratamento.

CNa ($\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}$)

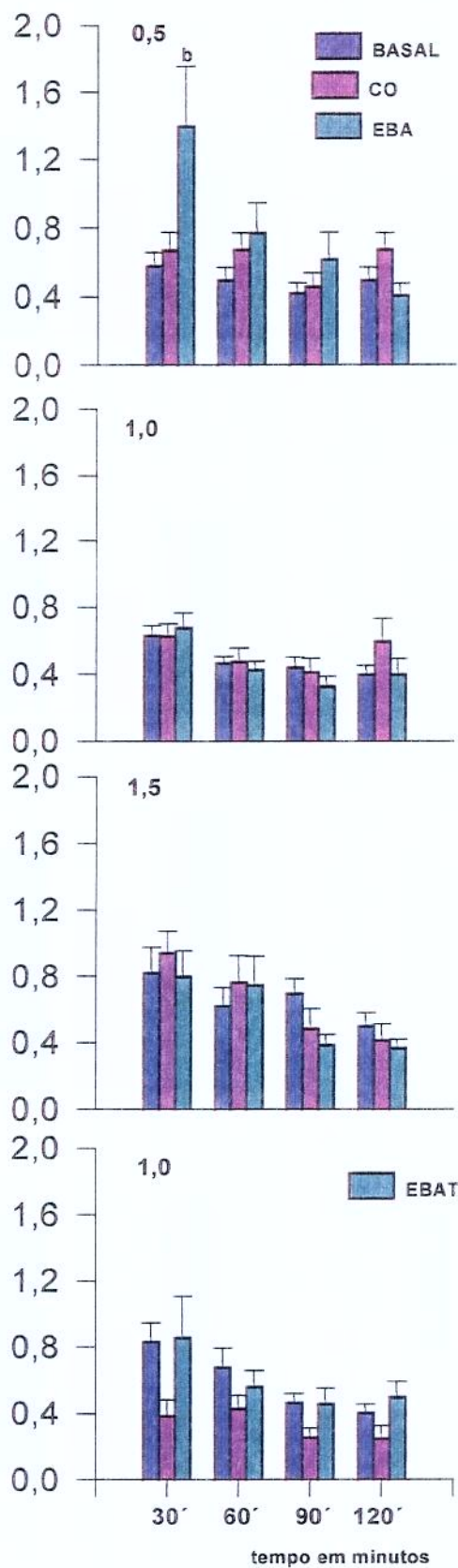


Figura 6: Clearance de sódio após a 2^a semana de tratamento dos animais com água, veículo e EBA nas doses de 0,5; 1,0 e 1,5 g/kg/peso e 1,0 g/kg/peso de EBAT.

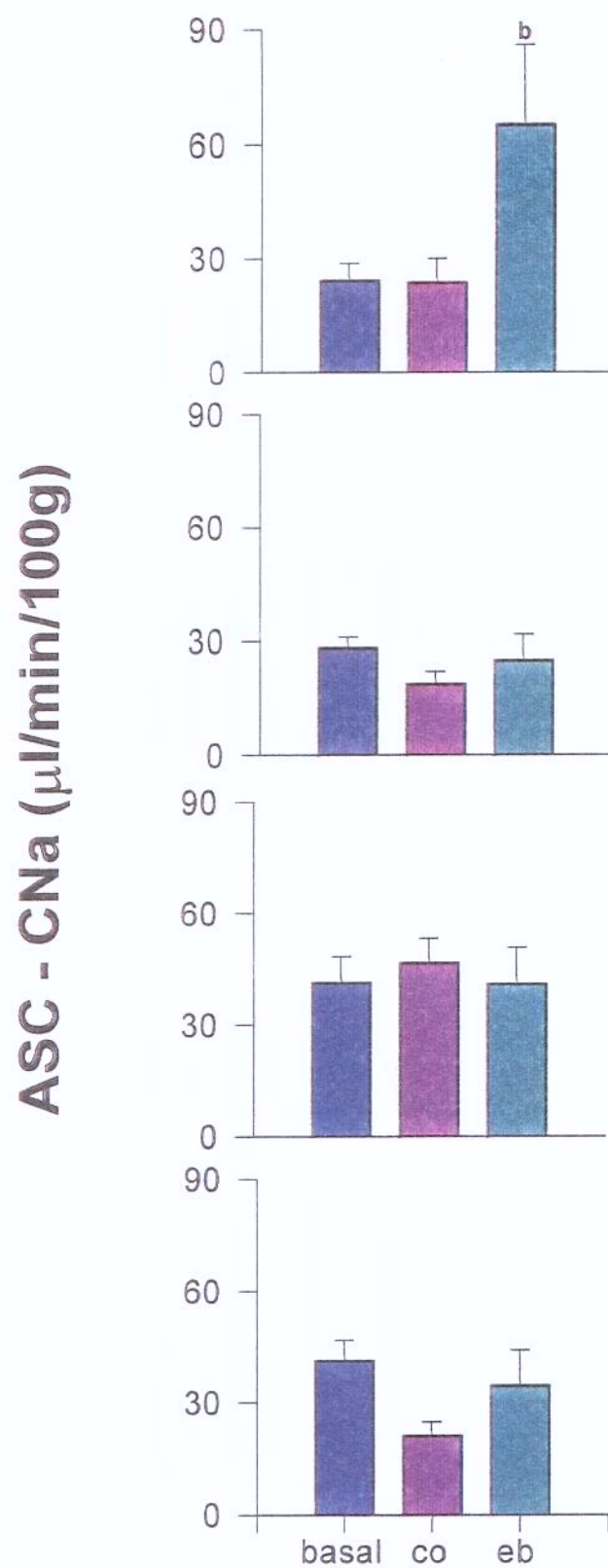


Figura 6': Área sobre a curva correspondente ao *clearance* de sódio após 2ª semana de tratamento.

Fração de Excreção de Potássio (%)

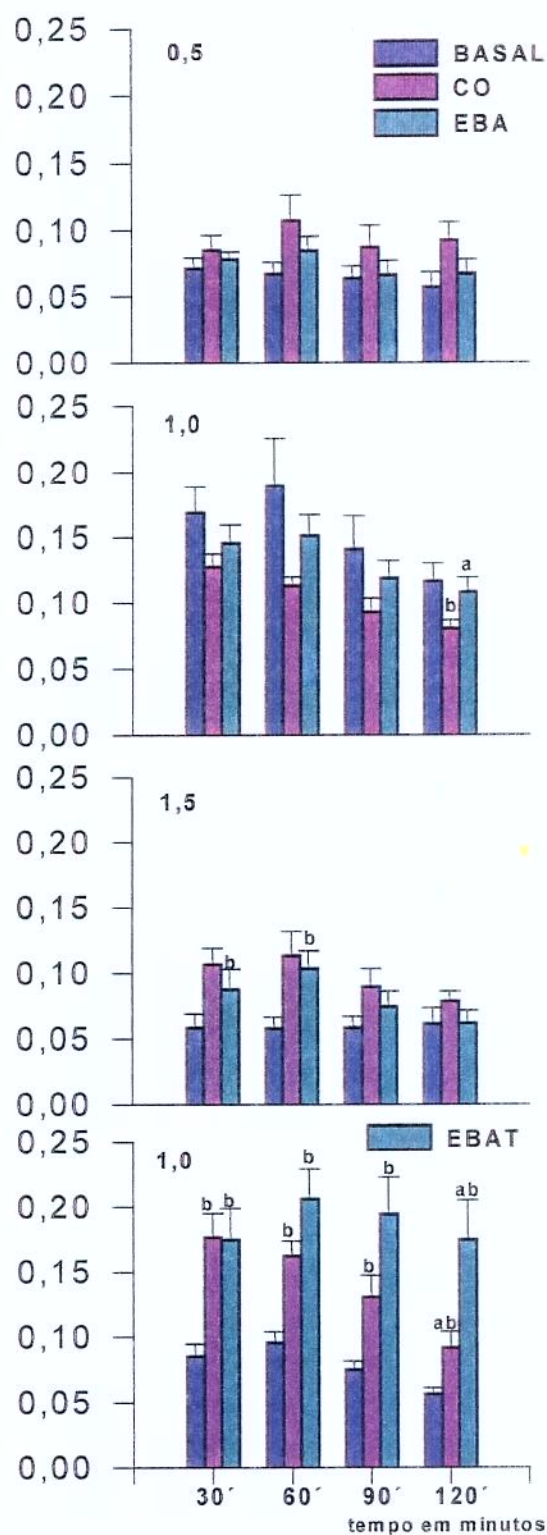


Figura 7: Excreção Fracional de Potássio após a 1ª semana de tratamento dos animais com água, veículo e EBA nas doses de 0,5; 1,0 e 1,5 g/kg/peso e 1,0 g/kg/peso de EBAT.

ASC - FEK (%)

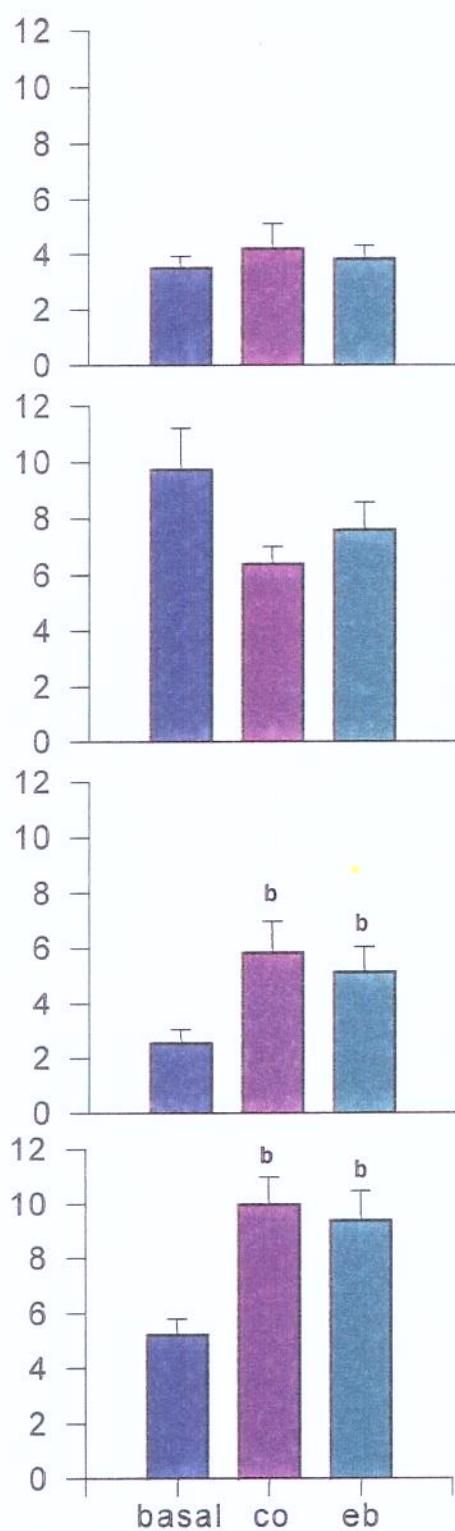


Figura 7': Área sobre a curva correspondente à fração de excreção de potássio após 1ª semana de tratamento.

Fração de Excreção de Potássio (%)

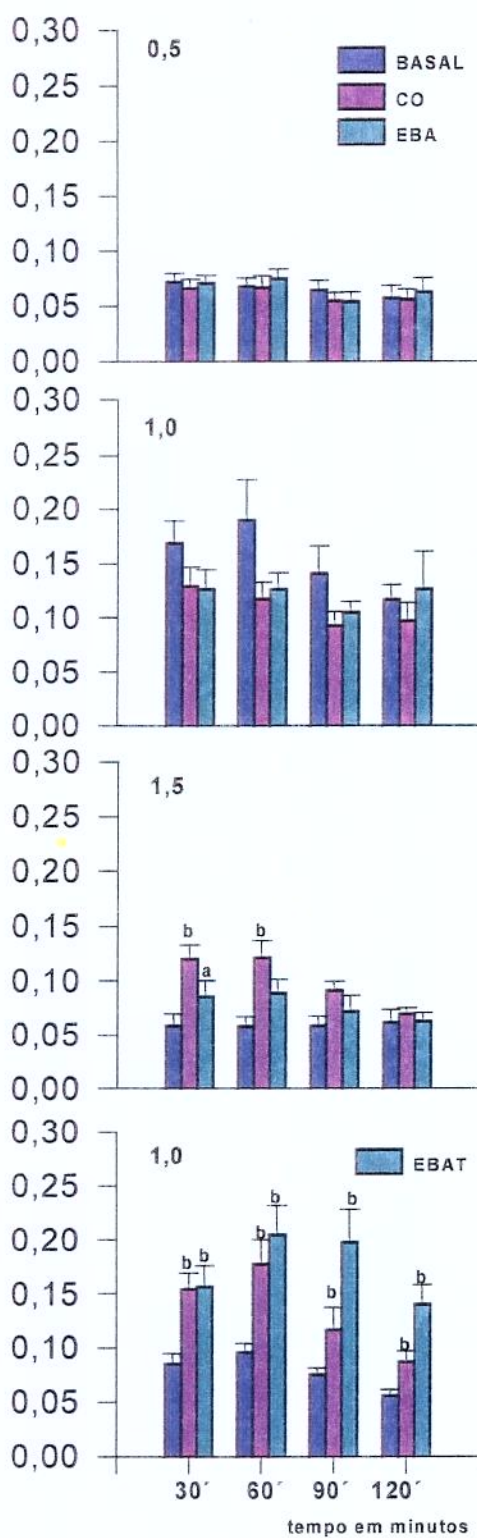


Figura 8: Excreção Fracional de Potássio após a 2ª semana de tratamento dos animais com água, veículo e EBA nas doses de 0,5; 1,0 e 1,5 g/kg/peso e 1,0 g/kg/peso de EBAT.

ASC - FEK (%)

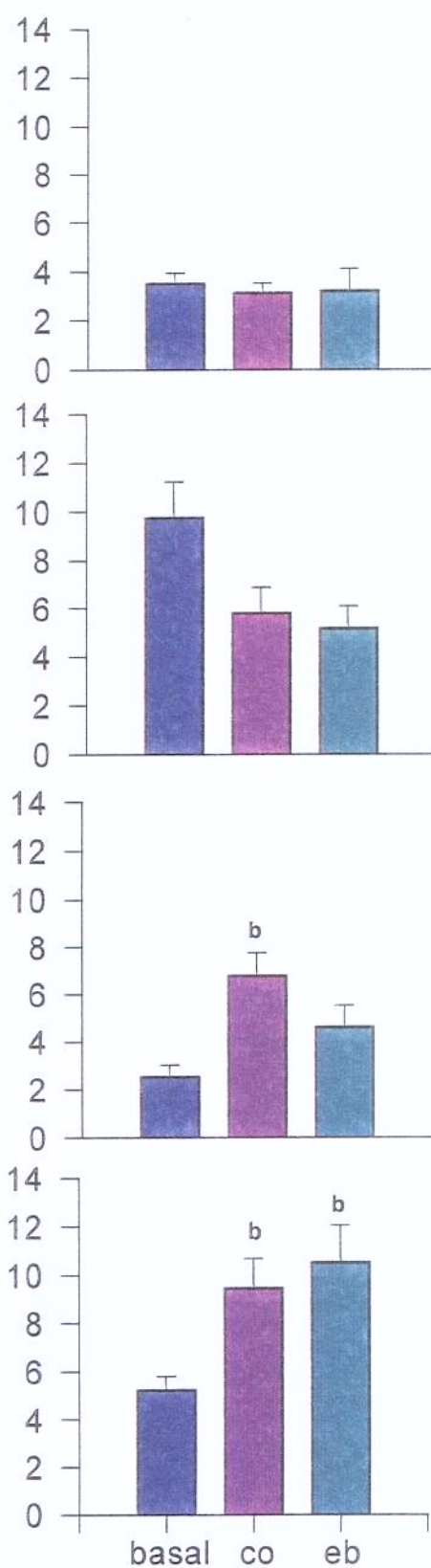


Figura 8': Área sobre a curva correspondente à fração de excreção de potássio após 2ª semana de tratamento.

FENa (%)

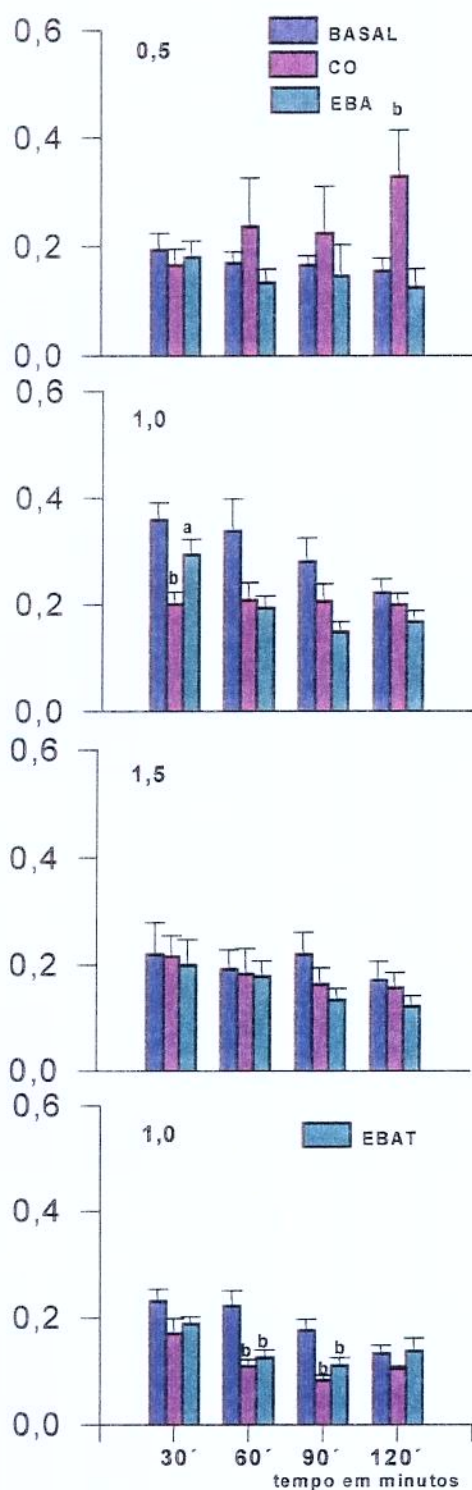


Figura 9: Excreção Fracional de Sódio após a 1ª semana de tratamento dos animais com água, veículo e EBA nas doses de 0,5; 1,0 e 1,5 g/kg/peso e 1,0 g/kg/peso de EBAT.

ASC - FENa (%)

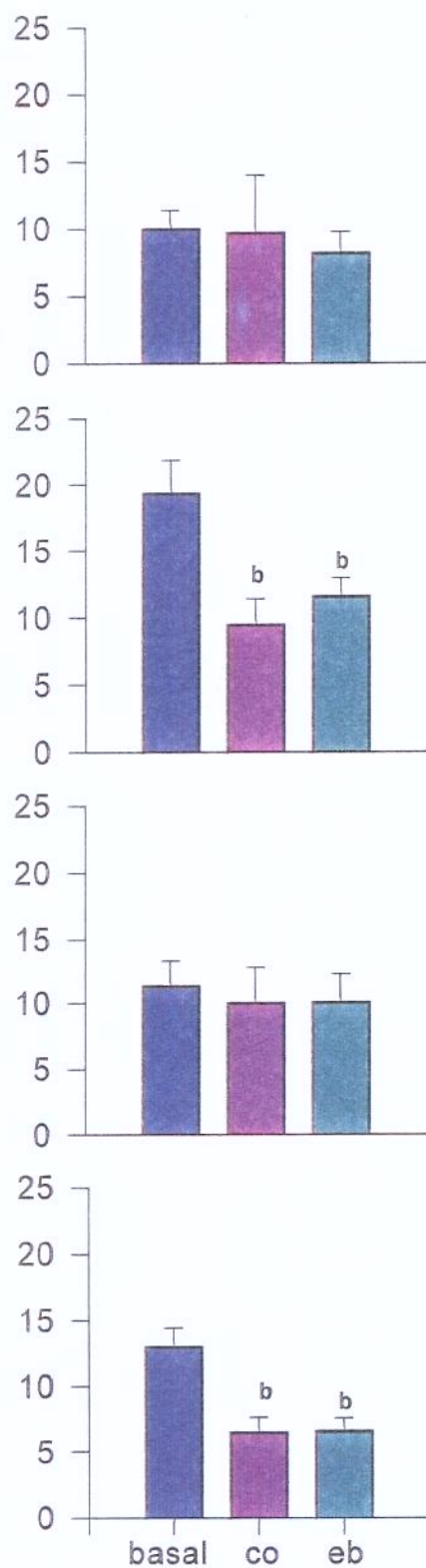


Figura 9': Área sobre a curva correspondente à fração de excreção de sódio após 1^a semana de tratamento.

FENa (%)

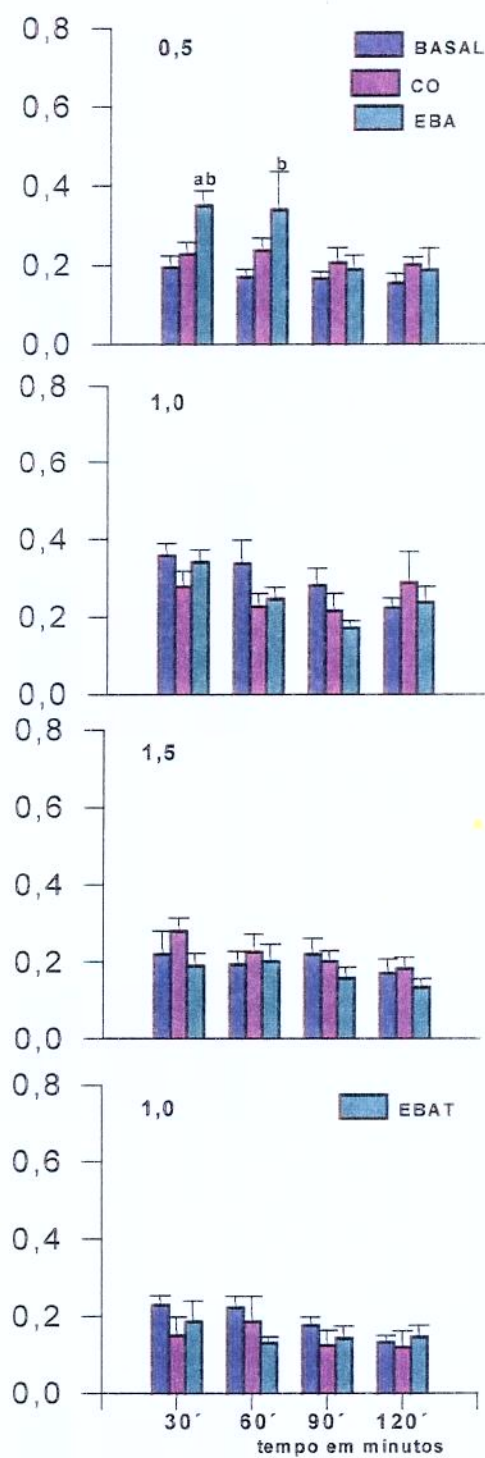


Figura 10: Excreção Fracional de Sódio após a 2ª semana de tratamento dos animais com água, veículo e EBA nas doses de 0,5; 1,0 e 1,5 g/kg/peso e 1,0 g/kg/peso de EBAT.

ASC - FENa (%)

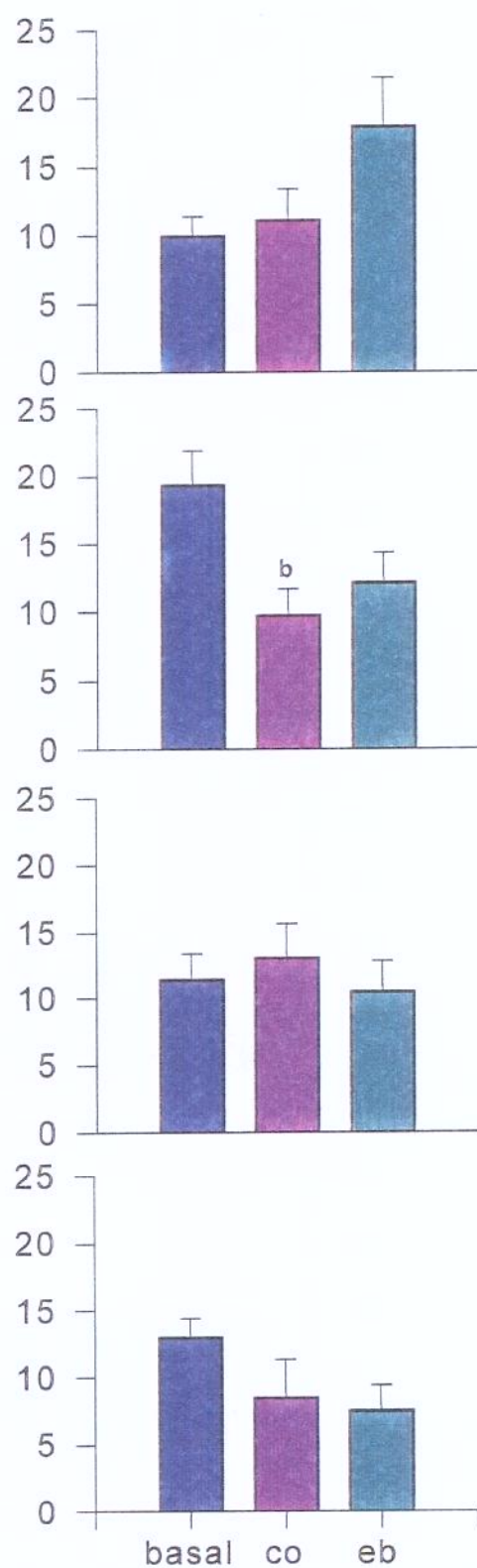


Figura 10': Área sobre a curva correspondente à fração de excreção de sódio após a 2ª semana de tratamento.

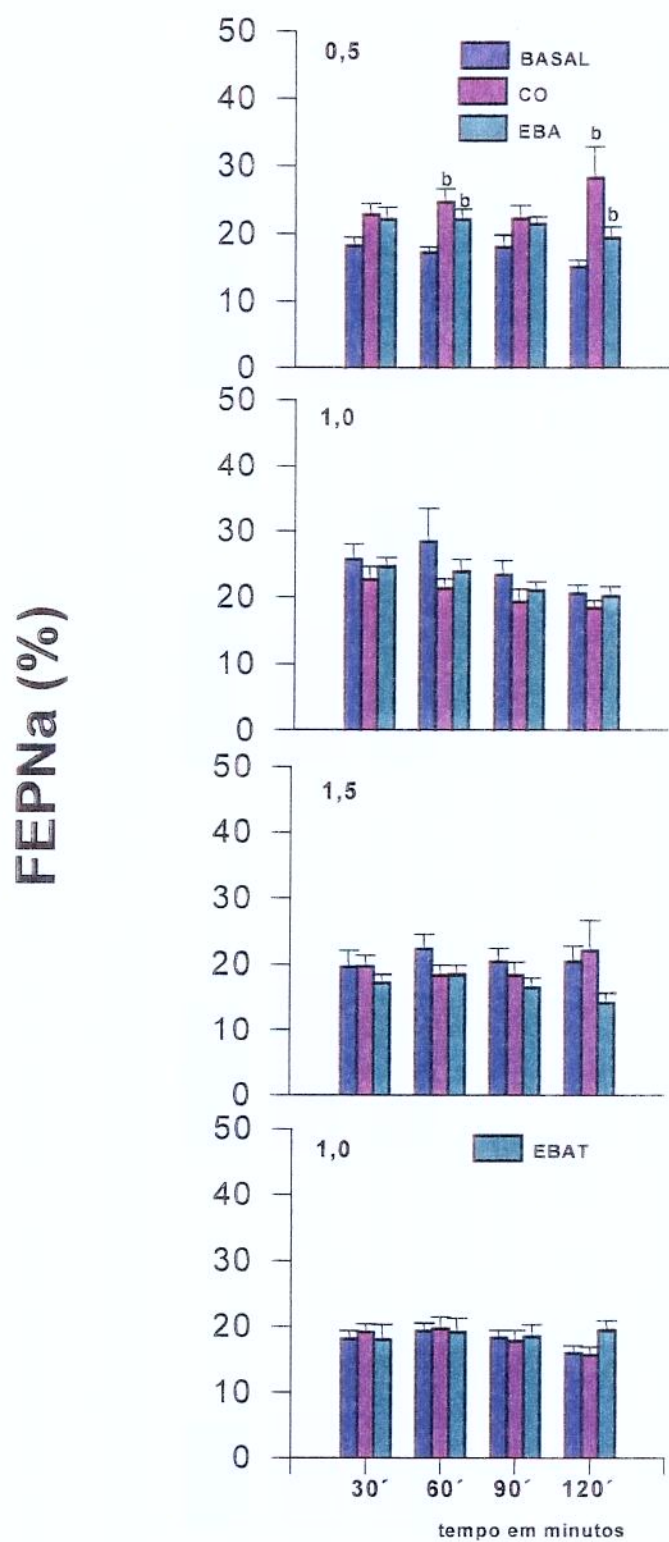


Figura 11: Excreção Fracional Proximal de Sódio após a 1ª semana de tratamento dos animais com água, veículo e EBA nas doses de 0,5; 1,0 e 1,5 g/kg/peso e 1,0 g/kg/peso de EBAT.

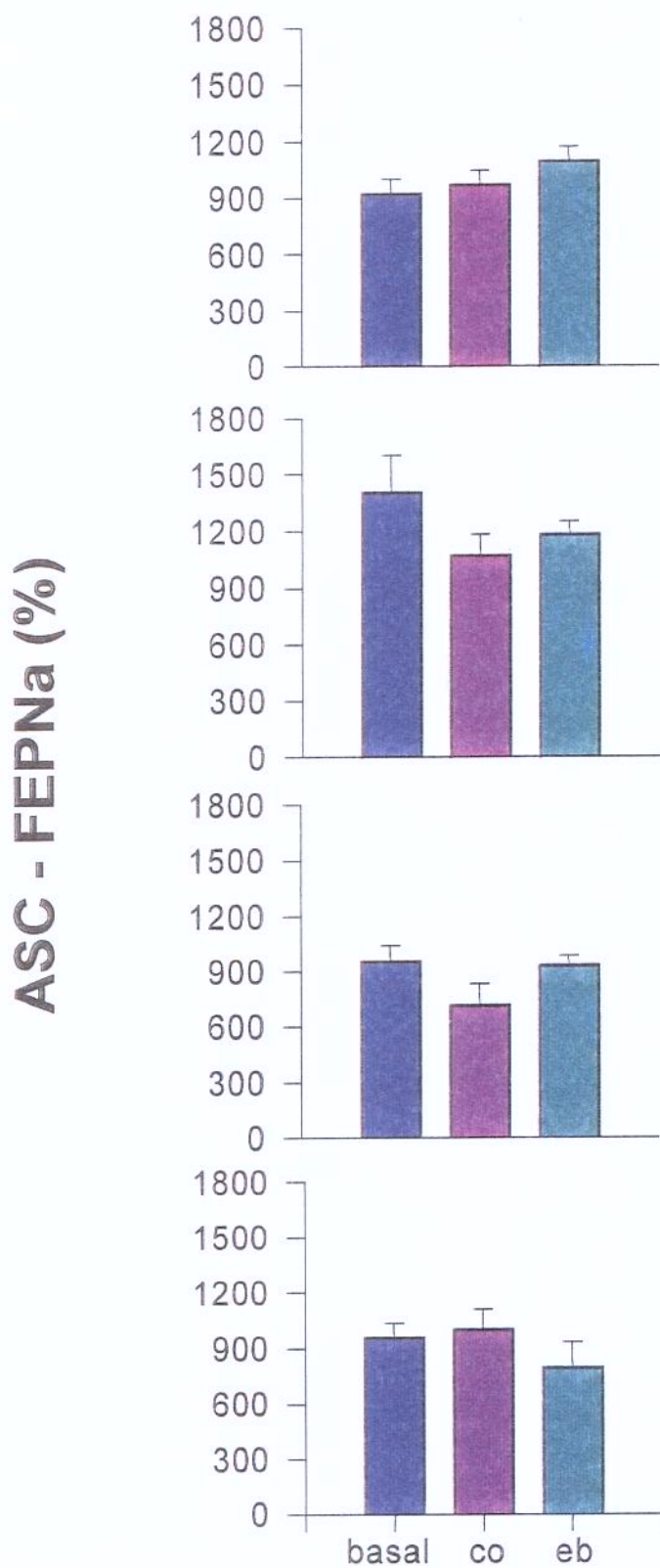


Figura 11': Área sobre a curva correspondente à fração de excreção proximal de sódio após a 1ª semana de tratamento.

FEPNa (%)

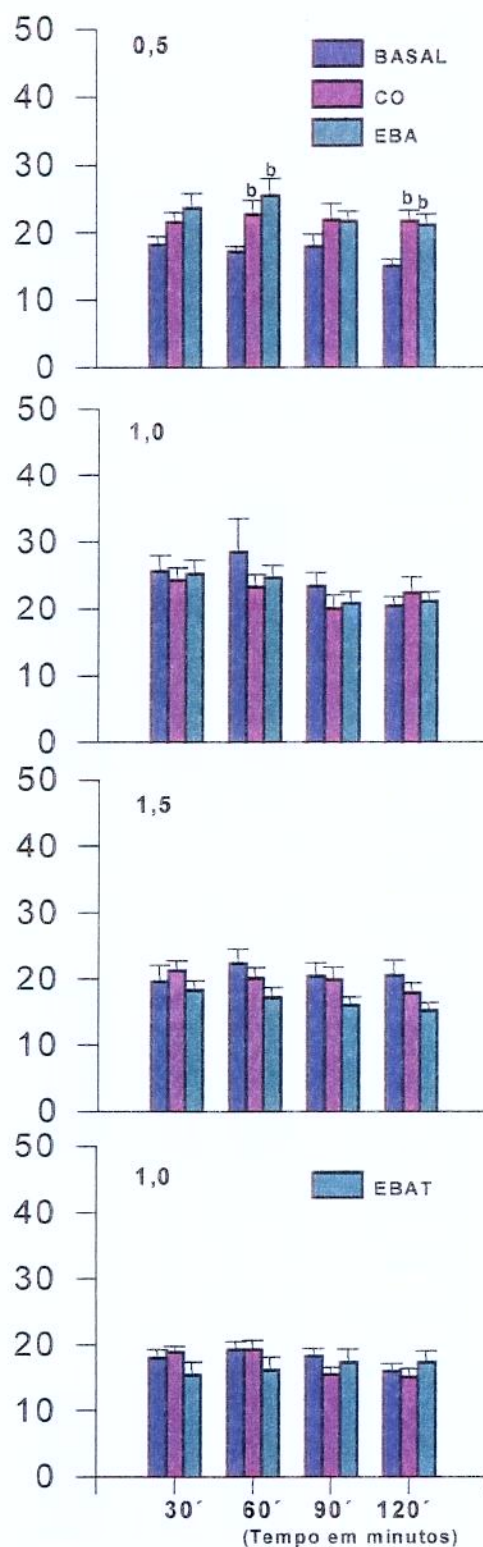


Figura 12: Excreção Fracional Proximal de Sódio após a 2ª semana de tratamento dos animais com água, veículo e EBA nas doses de 0,5; 1,0 e 1,5 g/kg/peso e 1,0 g/kg/peso de EBAT.

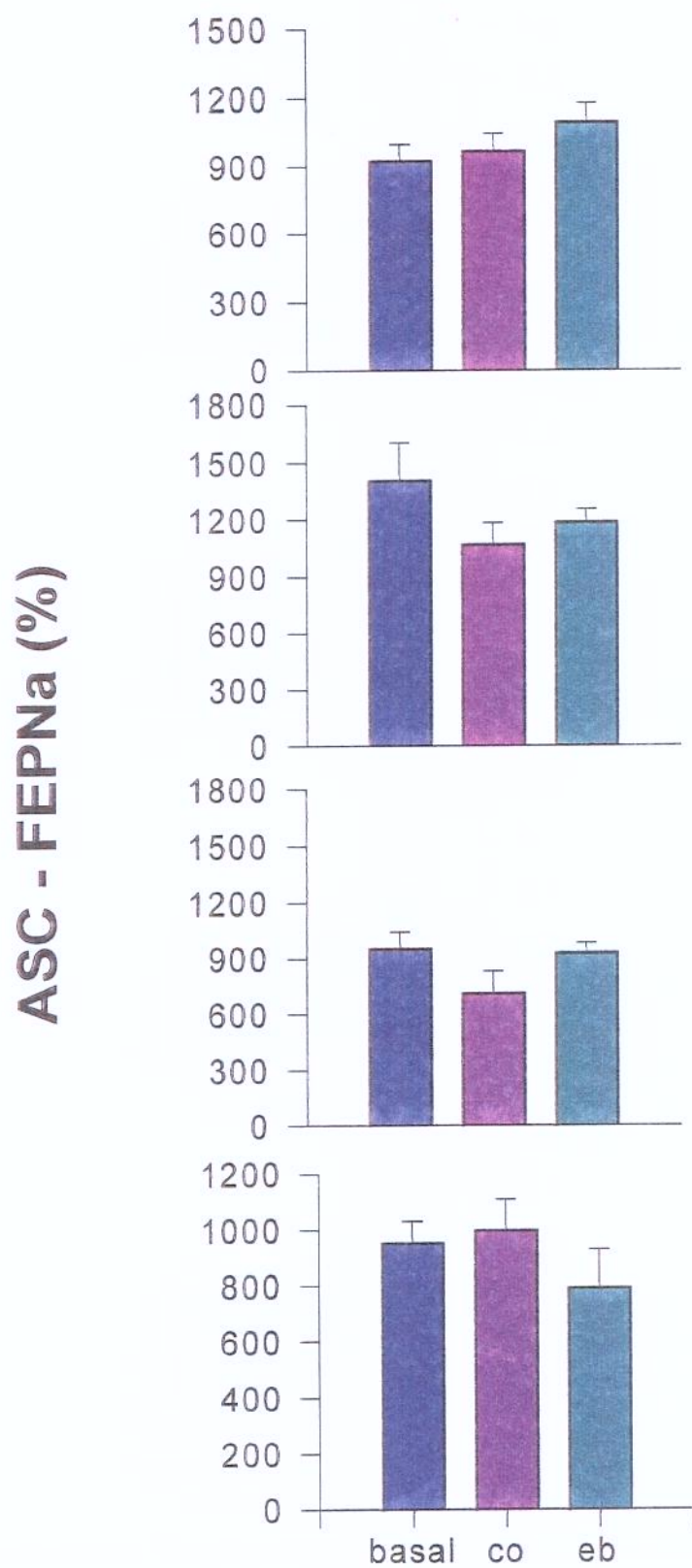


Figura 12': Área sobre a curva correspondente à fração de excreção proximal de sódio após a 2ª semana de tratamento.

FEPPNa (%)

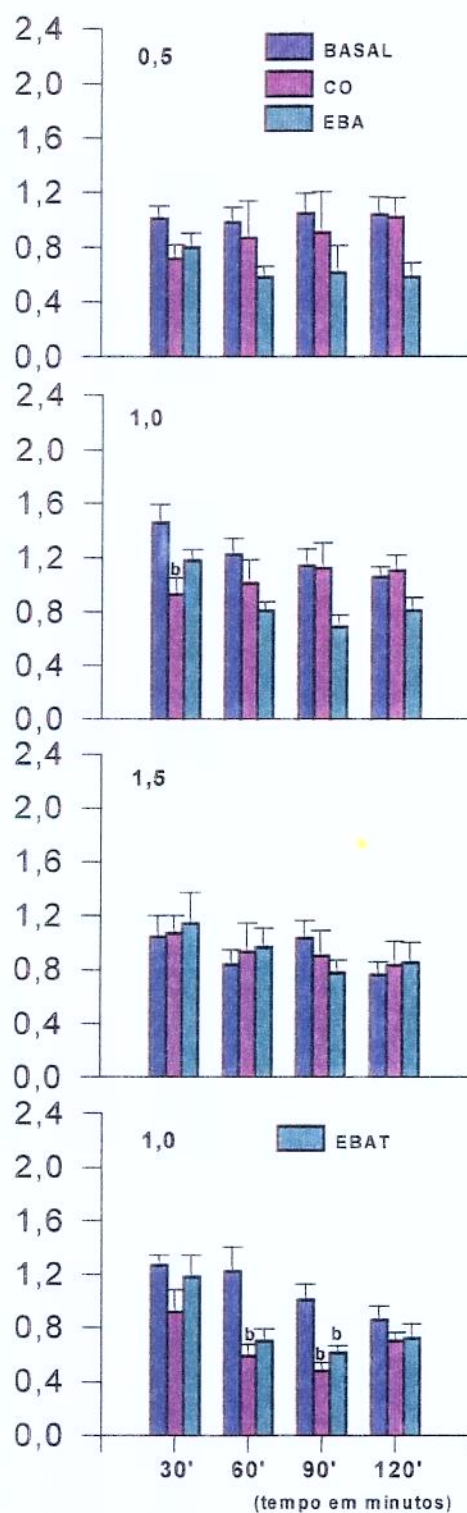


Figura 13: Excreção Fracional Pós-Proximal de Sódio após a 1ª semana de tratamento dos animais com água, veículo e EBA nas doses de 0,5; 1,0 e 1,5 g/kg/peso e 1,0 g/kg/peso de EBAT.

ASC - FEPPNa (%)

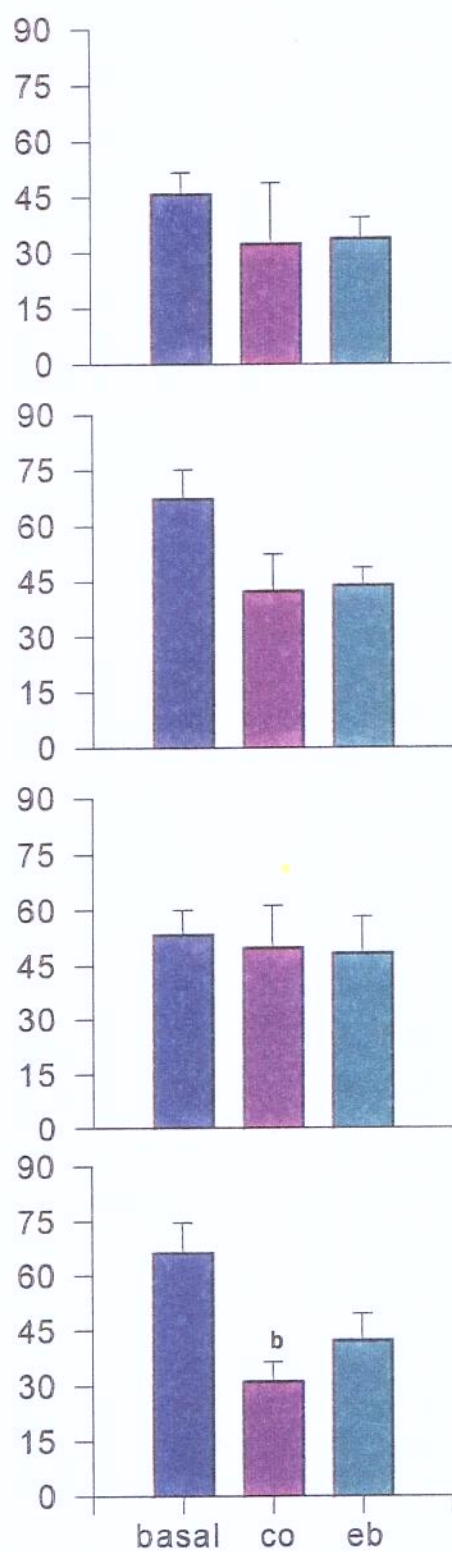


Figura 13': Área sobre a curva correspondente à fração de excreção pós-proximal de sódio após a 1ª semana de tratamento.

FEPPNa (%)

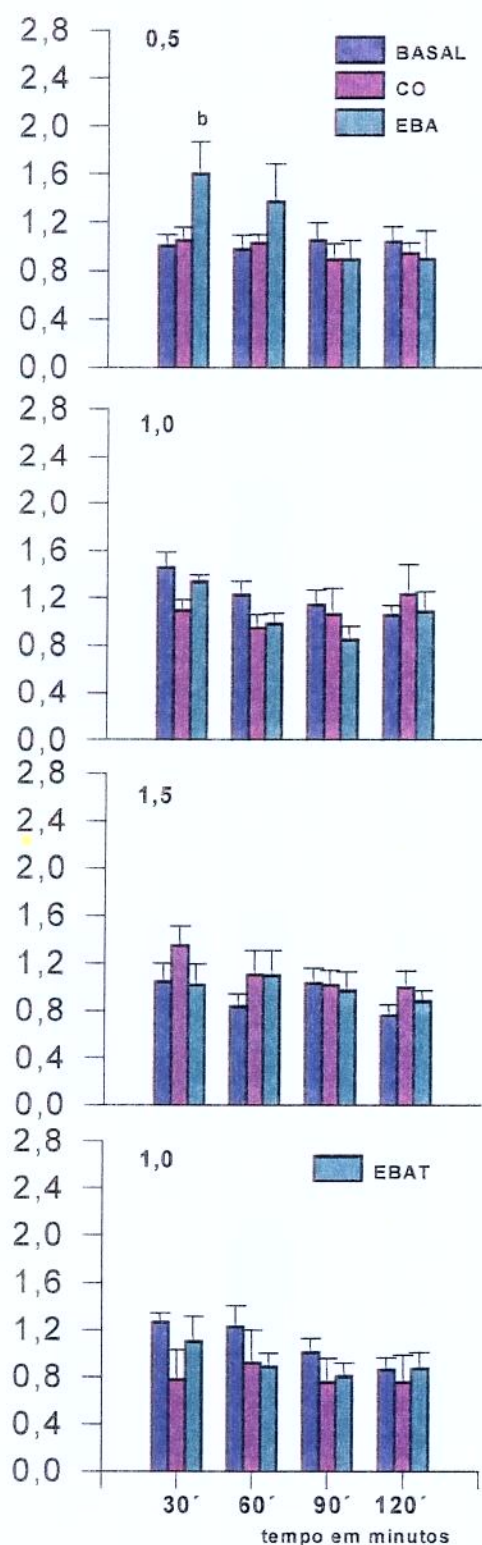


Figura 14: Excreção Fracional Pós-Proximal de Sódio após a 2ª semana de tratamento dos animais com água, veículo e EBA nas doses de 0,5; 1,0 e 1,5 g/kg/peso e 1,0 g/kg/peso de EBAT.

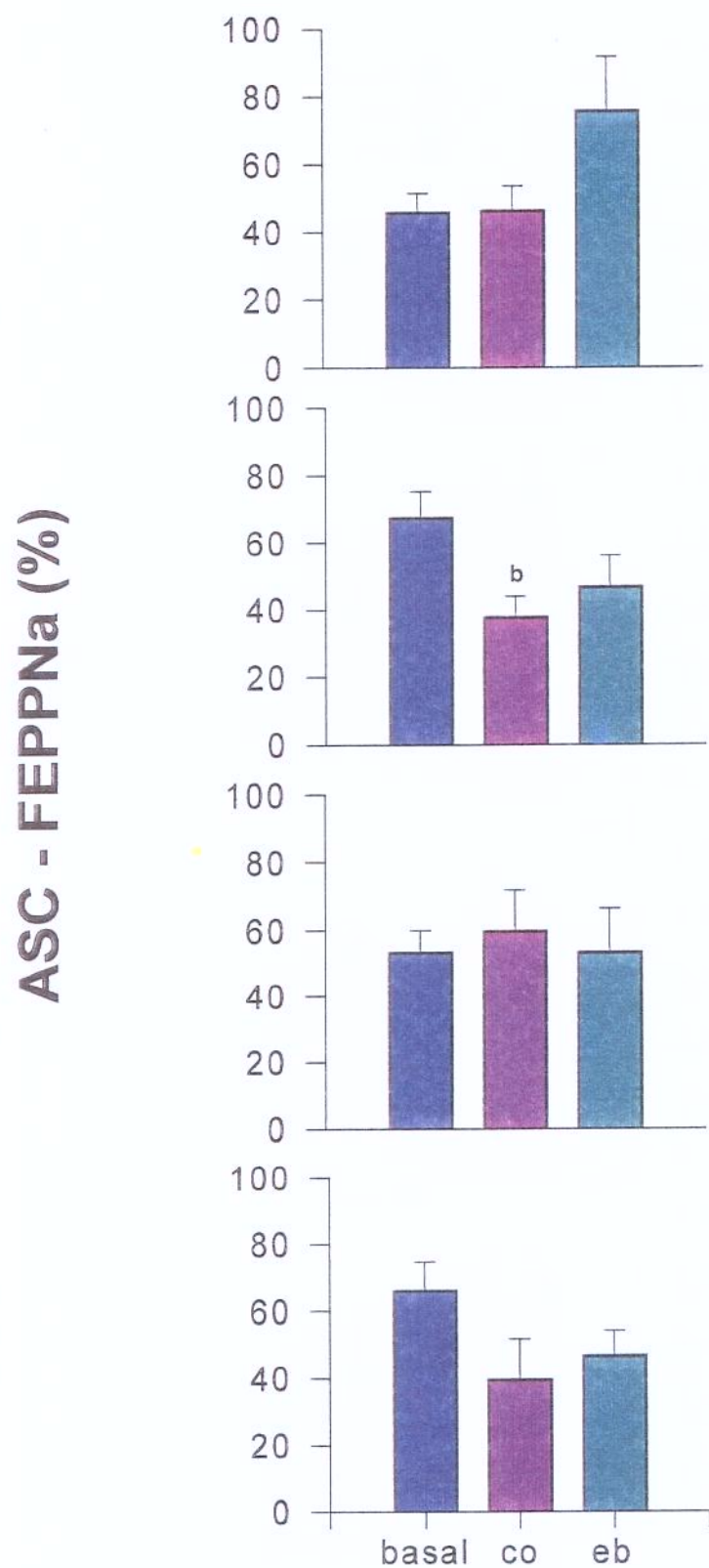


Figura 14': Área sobre a curva correspondente à fração de excreção pós-proximal de sódio após a 2^a semana de tratamento.

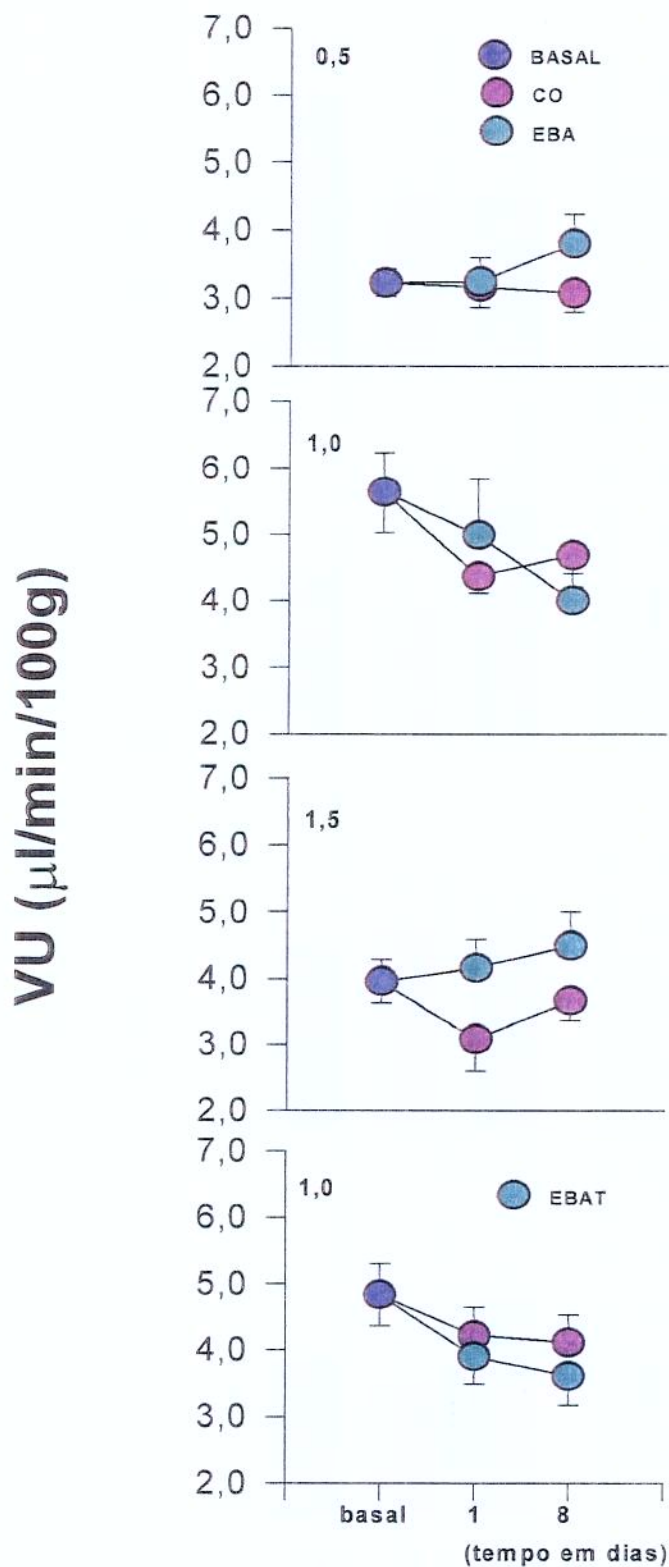


Figura 15: Fluxo Urinário de 15 horas avaliado durante 3 semanas consecutivas, após administração diária de veículo, EBA nas doses de 0,5; 1,0 e 1,5 g/kg/peso e EBAT na dose de 1,0 g/kg/peso (1 e 8 = após o tratamento).

Carga Excretada de Potássio ($\mu\text{Eq}/\text{min}/100\text{g}$)

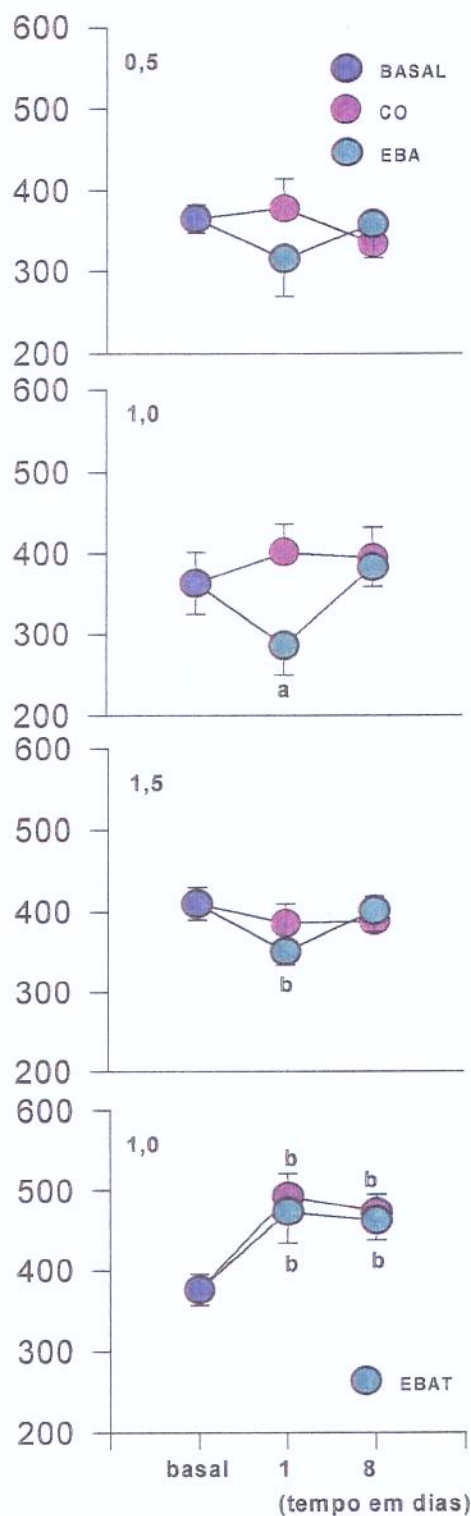


Figura 16: Carga Excretada de Potássio avaliada durante 3 semanas consecutivas, após administração diária de veículo, EBA nas doses de 0,5; 1,0 e 1,5 g/kg/peso e EBAT na dose de 1,0 g/kg/peso (1 e 8 = após o tratamento).

Carga Excretada de Sódio ($\mu\text{Eq}/\text{min}/100\text{g}$)

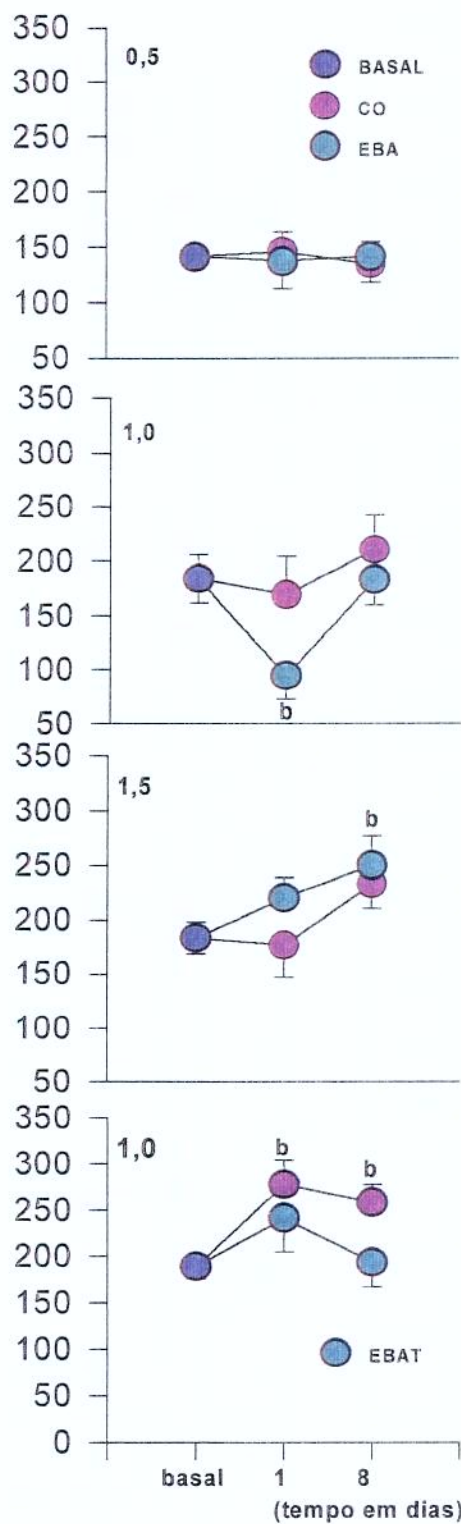


Figura 17: Carga Excretada de Sódio avaliada durante 3 semanas consecutivas, após administração diária de veículo, EBA nas doses de 0,5; 1,0 e 1,5 g/kg/peso e EBAT na dose de 1,0 g/kg/peso (1 e 8 = após o tratamento).

Proteinúria ($\mu\text{Eq}/\text{min}/100\text{g}$)

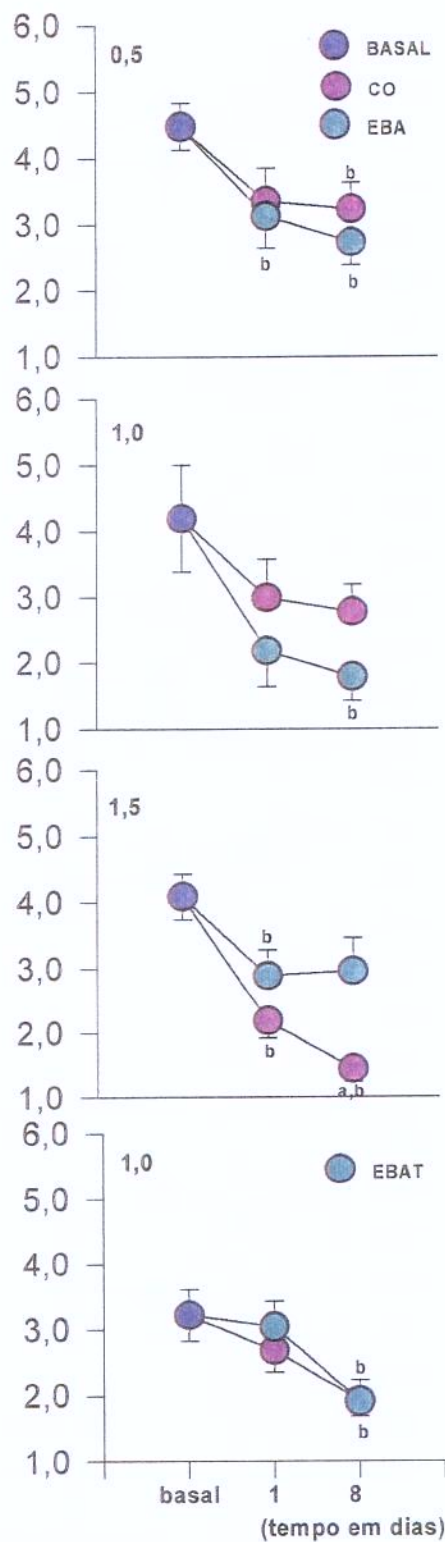


Figura 18: Proteinúria avaliada durante 3 semanas consecutivas, após administração diária de veículo, EBA nas doses de 0,5; 1,0 e 1,5 g/kg/peso e EBAT na dose de 1,0 g/kg/peso (1 e 8 = após o tratamento).

Pressão Arterial Caudal (mmHg)

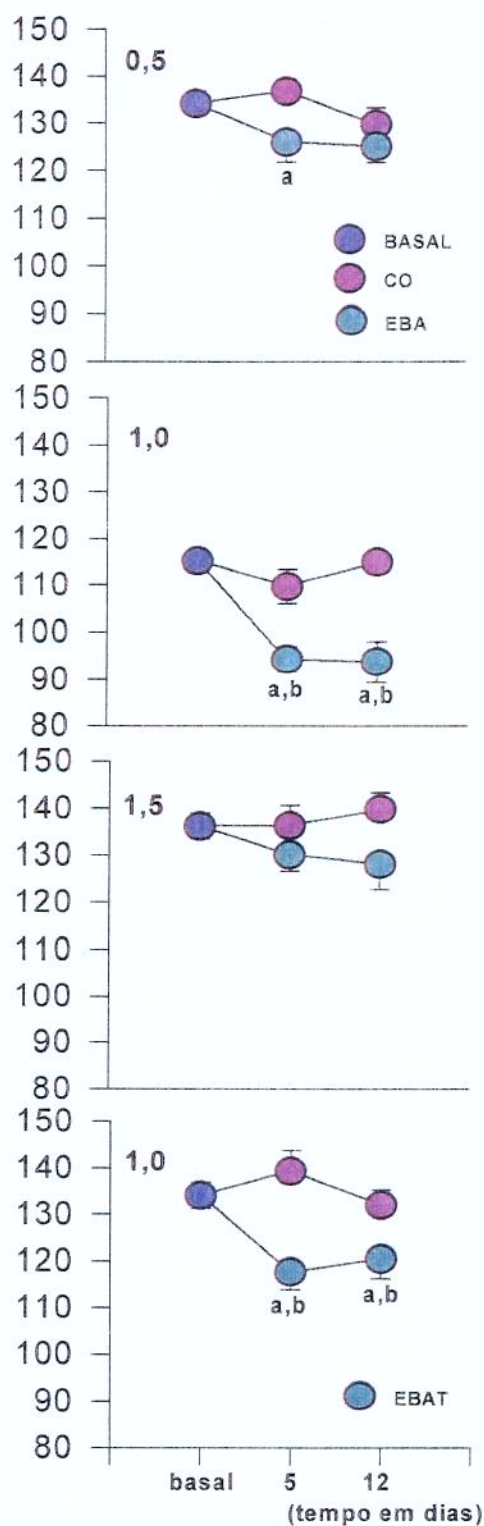


Figura 19: Registro da PAC avaliada durante 3 semanas consecutivas, após administração diária de veículo, EBA nas doses de 0,5; 1,0 e 1,5 g/kg/peso e EBAT na dose de 1,0 g/kg/peso (5 e 12 = após o tratamento).

Diferença percentual diária do peso (%)

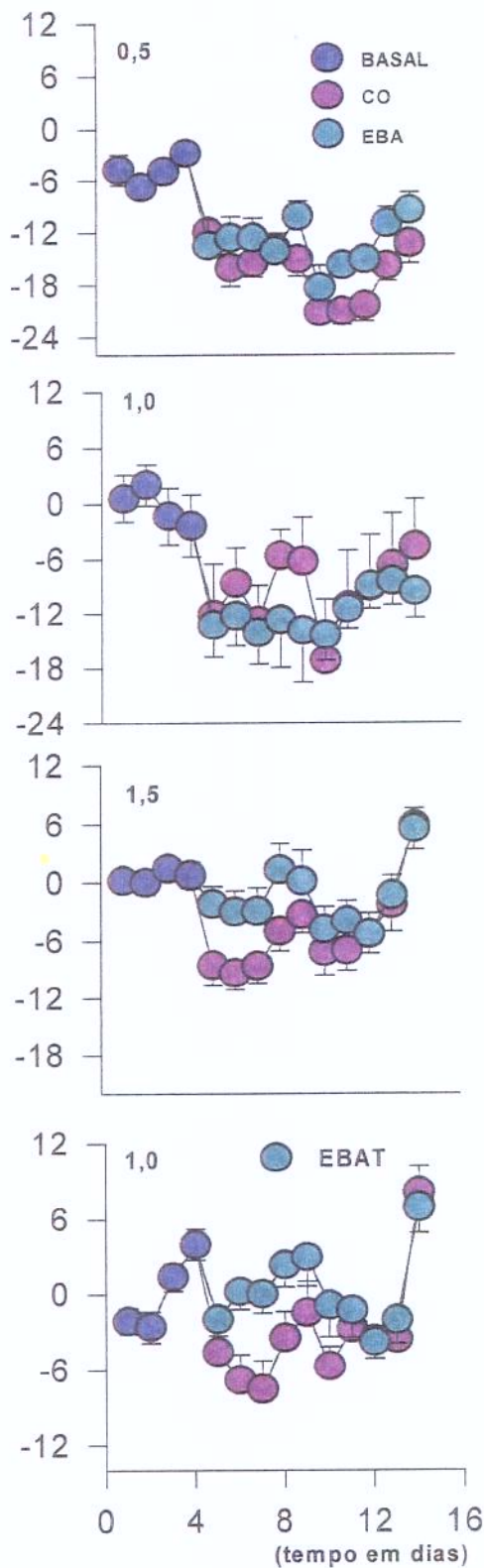


Figura 20: Diferença diária de peso corporal, através da medida diária durante as 3 semanas de experimento.

5.DISSCUSSÃO

Estudos sobre a função renal e a pressão arterial sistólica obtidos após a administração oral do extrato bruto hidroalcoólico aquecido de *Vernonia polyanthes* Less. (EBA) são praticamente inexistentes. A preparação de folhas de *Vernonia polyanthes* é utilizada pela população por seus efeitos diuréticos e para o tratamento de problemas respiratórios tais como asma e bronquites (GEMTCHÚJNICOV, 1976; CARIBÉ & CAMPOS, 1991; SACRAMENTO *et al.*, 1996).

No presente trabalho o extrato foi administrado em diferentes concentrações, curva dose-resposta, em animais acordados não-restritos, para o estudo de possíveis ações sobre a pressão arterial e a função renal. Para a presente avaliação foram utilizadas três doses crescentes do EBA: 0,5; 1,0 e 1,5 g/kg/peso corporal e também extrato bruto aquecido total (EBAT) obtido na dose de 1,0 g/kg/peso corporal.

A dose de 0,5 g/kg do EBA não promoveu modificações na filtração glomerular estimada pelo estudo do *clearance* de creatinina e mantendo esse parâmetro constante após as duas semanas de tratamento. No entanto, observamos um aumento significativo do *clearance* de lítio após 90 min da avaliação, sugerindo uma ação tubular direta do EBA e causando uma rejeição proximal de sódio quando comparado aos valores basais. Este aumento do CL_{Li} foi associado à elevação simultânea da fração de excreção proximal de sódio, promovendo então uma queda na reabsorção tubular desse eletrólito.

Associado a esse aumento da FEPNa, nestes animais observamos uma forte tendência em aumentar a fração de reabsorção pós-proximal de sódio, possível mecanismo resbsortivo compensatório por esse segmento tubular da rejeição proximal. Após duas semanas de tratamento com o extrato bruto a fração de excreção de sódio e o *clearance* de sódio mostraram-se elevados, enfatizando nesta fase uma proeminente queda na reabsorção tubular de sódio sob efeito do EBA.

Por outro lado, após a primeira semana da administração de 0,5 g/kg do extrato de *Vernonia* foi observada uma queda significativa da pressão arterial caudal quando comparada aos animais do grupo controle. Estes resultados sugerem que na dose de 0,5 g/kg/dia possivelmente o extrato bruto aquecido da *Vernonia polyanthes* tenha uma ação tubular direta no segmento proximal do nefron, promovendo uma queda da reabsorção local

de sódio evidenciada pelo aumento na FENa e consequentemente, pelo menos em parte contribuir par uma queda de pressão arterial observada num primeiro instante, como resultado do volume extracelular.

Após a administração de 1,0 g/kg/peso corporal do EBA, novamente observa-se uma queda significativa e persistente da pressão arterial caudal durante as duas semanas consecutivas de estudo. Neste caso, essa queda foi isolada, isto é, sem modificações dos parâmetros analisados para função renal.

A queda pressórica observada poderia ter sido uma resposta à ação direta do extrato da *Vernonia* sobre a musculatura lisa vascular, ocasionando assim uma substancial diminuição da resistência vascular periférica. Tem sido evidenciado que alguns componentes encontrados nas plantas, como *hirsutine*, um tipo de alcalóide, possui atividade hipotensora, atuando nas células musculares lisas vasculares ou diminuindo diretamente a contratilidade miocárdica, podendo assim através de uma ação antagonista sobre canais de cálcio, diminuir a contratilidade muscular e também apresentar uma atividade anti-arrítmica (OZAKI, 1989; OZAKI, 1990; MASUMIYA *et al.*, 1999).

Os testes fitoquímicos qualitativos realizados para o presente trabalho no extrato bruto aquecido, no entanto, não detectaram a presença de alcalóides, tornando pouco provável a participação deste princípio ativo nos receptores obtidos, não afastando entretanto, a possibilidade de que outras substâncias relacionadas também ao bloqueio de canais de cálcio ou liberação parácrina de substâncias vasoativas possam participar do processo.

A *Vernonia glabra*, espécie do mesmo gênero da *Vernonia*, produz lactonas que são encontradas também na *Vernonia polyanthes*. Experimentos prévios realizados com a *Vernonia glabra* comprovaram sua atividade cardiodepressora, promovendo uma queda das pressões arterial sistólica, diastólica e média (ACHOLA *et al.*, 1996).

Em nosso trabalho, por se tratar de um estudo preliminar e abordando aspectos fisiológicos do animal como um todo, não houve um estudo específico e quantitativo das frações isoladas do extrato de *Vernonia*. Mediante resultados já observados em outros

estudos com plantas da mesma família, é possível presumir indicações de uma provável ação hipotensora e natriurética de princípios ativos existentes, mais ainda desconhecidos para extratos da *Vernonia polyanthes*.

A análise dos resultados obtidos após o tratamento dos animais com *Vernonia polyanthes* na dose de 1,5 g/kg/dia verificamos que o extrato bruto promoveu uma queda na filtração glomerular quando comparado ao grupo controle, estimada pelo CCr após 120 min de tratamento. Uma queda persistente e significativa também foi observada após duas semanas para o CLi, associada a uma importante reabsorção proximal de sódio e queda do CNa. Estes resultados sugerem que o decréscimo pressórico pode desencadear a ativação de mecanismos contrareguladores antagonizando os mecanismos relacionados à diminuição da pressão arterial, particularmente relacionados à expansão do volume extracelular. Esta afirmativa é sustentada pela observação da queda no CLi e CCr, adicionado a uma forte tendência à redução da FEPNa.

A queda evidenciada no CCr reflete também sobre carga filtrada de sódio favorecendo a uma menor excreção urinária de sódio e água. Este decréscimo da carga filtrada pode estar relacionada a uma possível queda no fluxo sanguíneo renal, que por sua vez, seria resultado de uma intensa constrição arteriolar eferente. Esta redução na carga filtrada também poderiam promover a estimulação da reabsorção de sódio, através de mecanismos hemodinâmicos peritubulares ou pela ativação de sistemas neuro-humorais.

Aventamos que esta resposta para concentrações superiores a 1,0 g/kg/dia do extrato bruto de *Vernonia polyanthes* em questão, poderia estar promovendo uma vasoconstrição esplâncnica, particularmente renal, em resposta à queda da pressão arterial induzida. Outra possibilidade é que ação dos mecanorreceptores renais acionados pela diminuição do FSR responda aumentando a resistência das arteríolas glomerulares, o que adicionalmente acentuaria a queda da filtração glomerular e aumento na reabsorção tubular de sódio (GUYTON & HALL, 1997).

O tratamento com a dose de 1,0 g/kg/peso corporal com o EBAT durante duas semanas consecutivas em ratos Wistar promoveu uma queda persistente na pressão arterial caudal também acompanhada por alterações significativas no padrão de filtração

glomerular, estimado pelo *clearance* de creatinina. Adicionalmente, o tratamento com EBAT também promoveu uma diminuição transitória da fração de excreção de sódio acompanhada por uma queda na fração de excreção pós-proximal de sódio e um aumento na fração de excreção de potássio. Não observamos modificações significativas no manuseio proximal de sódio, a despeito de uma elevação significativa da filtração glomerular e consequentemente da carga filtrada de sódio, bem como um aumento claro do *clearance* de lítio, evidenciando uma provável rejeição proximal absoluta da carga filtrada que chega aos túbulos proximais.

Apesar dessa provável rejeição proximal, a FEPNa calculada não refletiu este aumento do CLi devido ao aumento concomitante da carga filtrada de sódio, mantendo assim, constante a razão $CLi/CCr = FEPNa$. A carga excretada de potássio também apresentou-se aumentada nos grupos tratados, provavelmente consequência da alta concentração deste íon no extrato da planta, o qual foi administrado ao grupo veículo na mesma proporção ou como consequência provável de um aumento da secreção distal de K^+ relacionado a elevação da reabsorção nos segmentos pós-proximais de Na^+ . Embora no presente trabalho não tenhamos efetuado estudos avaliando a atividade neural renal e do sistema renina-angiotensina-aldosterona, não podemos afastar tal possibilidade compatível com os resultados apresentados neste trabalho.

A maneira de preparação do extrato de *Vernonia* utilizado nesse trabalho, foi similar àquela aplicada pela população no tratamento de doenças respiratórias como: asma, bronquite e também em doenças renais (CARIBÉ & CAMPOS, 1991). Os resultados apresentados demonstram que o tratamento crônico com o extrato hidroalcoólico de *Vernonia polyanthes* Less. não interfere na ingestão sólida e ingestão líquida do animal, bem como no ganho de peso corporal.

O extrato bruto de *Vernonia* pode influenciar na reabsorção tubular pelo efeito direto no transporte tubular de sódio ou mecanismos hemodinâmicos envolvendo uma redução no fluxo sanguíneo medular. O mecanismo do néfron e o local em que ocorrem as mudanças do manuseio renal de sódio não haviam sido identificados até o momento. No presente estudo, a queda na fração de excreção de sódio seguida pelo aumento da fração de reabsorção pós-proximal entre o sétimo e décimo quarto dia após a administração de EBAT, foi observado em relação ao aumento da carga filtrada de sódio.

Embora o fluxo sanguíneo renal e resistência vascular não fossem medidas nesta ocasião, ocorreu um aumento da filtração glomerular após a administração do EB, sugerindo uma vasodilatação na arteriola aferente. Com isso, esses dados propõem a interferência de mecanismos tubulares na conservação de sódio e água, o que resultaria numa resposta anti-natriurética, compensatória dos segmentos distais do nefron em resposta à diminuição da pressão arterial. A persistente e significativa queda na pressão arterial produzida pela administração de EB, poderia ser compensada pela proeminente retenção tubular de sódio observada. O mecanismo preciso envolvido na queda da pressão arterial após administração por duas semanas de EB, não foi identificado, embora haja clara evidência de que mecanismos relacionados ao controle da pressão arterial e o envolvimento renal na homeostase hidro-salina e pressórica não possam ser descartadas (GUYTON *et al.*, 1974; GUYTON, 1990).

Nossos resultados sugerem que uma ação natriurética pela ação tubular dos princípios ativos do extrato de *Vernonia* possam ser atenuadas pelo efeito concomitante deste sobre a pressão arterial associado a um aumento da reabsorção pós-proximal de sódio. Nestas condições experimentais como sublinhado acima, a caliurese após a administração do EBA pode ser explicada como consequência de um aumento de reabsorção distal de sódio, através da membrana transluminal (WRIGHT & GIEBISCH, 1992).

Estudos anteriores que examinaram o efeito de extratos da *Vernonia* sobre a excreção renal de sódio e na resposta pressórica têm sido contraditórios, talvez devido à diferenças nos métodos experimentais adotados, tais como tipo de anestesia, dose e forma de extração dos princípios ativos da planta e da via de administração do extrato escolhida (SCATENA, 1983; RIBEIRO *et al.*, 1986; SILVEIRA *et al.*, 2000). Esses fatores podem ter grande influência sobre a pressão de perfusão e a resistência vascular renal em resposta ao tratamento com EBA, modificando assim, a excreção de sódio.

Estudos fitoquímicos qualitativos do extrato hidroalcoólico da *Vernonia polyanthes* Less., *Vernonia cinerascens* e *Vernonia squamulosa* revelaram a presença de *hirsutinolides* (lignanais) e lactonas (BOHLMANN *et al.*, 1983; KOTOWICZ *et al.*, 1998; ABDEL-SATAR *et al.*, 2000). Tem-se mostrado que compostos da *Vernonia amygdalina* têm atividade miorelaxante sobre as células musculares lisas, do trato respiratório estudados

em porcos (KASONIA, 1995). Esse efeito demonstrado nas células musculares lisas podem explicar, pelo menos em parte, a resposta hipotensiva observada após a administração oral crônica da *Vernonia* em nossos estudos.

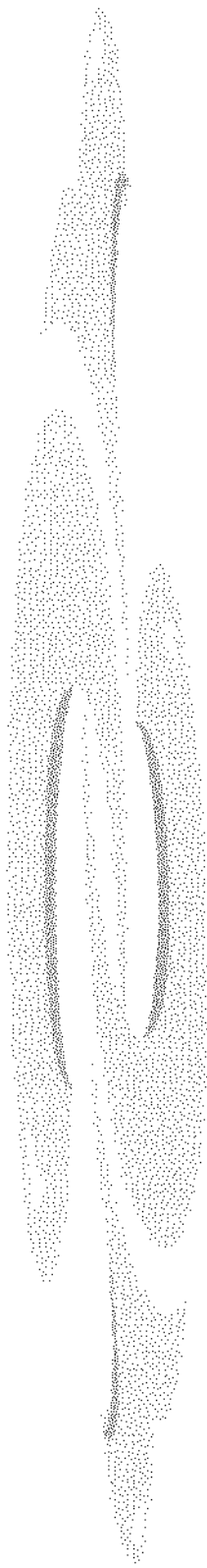
Algumas lignanas descobertas funcionam como defensoras do próprio organismo da planta em que é produzida (WILLIAMSON *et al.*, 1997). Outras ainda possuem atividades farmacológicas em investigação, destacando-se por possuírem atividade antiinflamatória (BARBOSA-FILHO, 2000). Estas têm sido testadas como anti-asmática, cujo possível mecanismo de ação seria através de uma inibição do fator de agregação plaquetária, que eventualmente também têm efeito vasoconstrictor. Estes testes foram realizados em músculo liso brônquico isolado e sua ação broncodilatadora foi registrada. Este efeito broncodilatador do extrato vegetal tem sido observado concomitantemente a um efeito inibitório destes sobre mediadores de processos inflamatórios (WILLIAMSON, 1997).

O presente estudo permitiu definir algumas ações dose-dependentes do extrato de *Vernonia polyanthes* Less. sobre a excreção renal de sódio, em resposta à administração oral por duas semanas em animais íntegros, vigis e sem restrição de movimentos, através de estudos da função global do rim em gaiolas metabólicas individuais.

Em conclusão, o mecanismo preciso pelo qual a *Vernonia polyanthes* Less. afeta o transporte de sódio pelo túbulo e as possíveis causas que modificaram a pressão arterial no presente trabalho ainda não podem ser totalmente elucidadas. Estudos funcionais e fitoquímicos futuros devem ser realizados para que se estabeleça e identifique os princípios ativos presentes em diferentes extratos da *Vernonia* que possam interferir no controle da pressão arterial e na homeostase funcional renal.

A respeito dos resultados obtidos com a triagem fitoquímica, podemos dizer que a *Vernonia polyanthes* Less. possui compostos químicos encontrados na maioria de família de plantas. Em nosso trabalho não foram realizados experimentos com as frações específicas do extrato bruto e por isso não poderíamos afirmar que um composto específico já identificado e estudado na literatura, principalmente em cultivos ou preparação isolados, fossem os responsáveis pelos efeitos evidenciados após a administração destes mesmos em animais *in totum*.

Contudo, trabalhos posteriores, tendo como base os dados obtidos no presente estudo poderão avaliar as frações específicas e desvendar os prováveis princípios ativos responsáveis pela queda pressórica significativa e pelas intrigantes mudanças observadas sobre a função renal.



6. CONCLUSÕES

Em conclusão, os resultados mais relevantes do presente trabalho mostram que na dose de 0,5 g/kg/dia a administração do EBA promoveu um aumento significativo da FENa associada a uma elevação da FEPPNa, sem modificações significativas da filtração glomerular. Por outro lado, a administração de EB de *Vernonia polyanthes* Less. 1,0 g/kg/dia causou uma queda significativa e sustentada da pressão arterial caudal nos animais; efeito não observado nos grupos controles.

Esta queda pressórica foi acompanhada por um aumento significativo da reabsorção tubular de sódio nos segmentos pós-proximais do néfron e de uma elevada excreção urinária de potássio. Estes dados sugerem que possivelmente em doses iguais ou inferiores a 0,5 g/kg/dia o extrato hidroalcoólico vegetal de *Vernonia polyanthes* tenha uma ação tubular direta sobre o néfron, enquanto em doses superiores (1,0 g/kg/dia) o efeito natriurético é minimizado pela acentuada ação hipotensora que ativa mecanismos contrareguladores na tentativa de restabelecer a homeostase hidro-salina e pressórica.

7. SUMMARY

The present study had how objective, evaluate the effect of crude *Vernonia polyanthes* Less. heating extract on arterial blood pressure and renal function. Grinded powder of *Vernonia polyanthes* Less. dried leaves were submitted to reflux with 70% ethanol for two hours. The material was filtered and the solution reduced under vacuum resulting the crude hydroalcoholic extract (CHE) in 35% yield. We compared the blood pressure and renal function in two animal groups of unanesthetized male Wistar-Hannover rats weighing approximately 300 to 400 g after one basal period: 1) control and 2) CHE-treated rats. Arterial pressure was measured weekly in conscious rats by tail-cuff method and renal function tests were performed in individual metabolic cages through of the lithium and creatinine clearance.

The results was obtained after oral administration of the CHE: 0,5; 1,0 and 1,5 g⁻¹ kg⁻¹ 100 g body weight⁻¹ on different doses through cold extraction post-reflow, or over direct extraction for reflow just one dose of the 1,0 g⁻¹ kg⁻¹ 100 g body weight⁻¹. On 0,5 dose g⁻¹ kg⁻¹ 100 g body weight⁻¹ occurred one significant increased of the lithium clearance from $56,72 \pm 5,27 \mu\text{l min}^{-1} 100 \text{ g body weight}^{-1}$ to $92,26 \pm 18,26 \mu\text{l min}^{-1} 100 \text{ g body weight}^{-1}$; the increased too occurred on the fractional urinary sodium excretion from $0,19 \pm 0,03 \%$ to $0,35 \pm 0,04 \%$ after two weeks of the treatment. The sodium clearance increased from $0,58 \pm 0,08 \mu\text{l min}^{-1} 100 \text{ g body weight}^{-1}$ to $1,4 \pm 0,36 \mu\text{l min}^{-1} 100 \text{ g body weight}^{-1}$, after two weeks of treatment. However, the arterial blood pressure not shown changes.

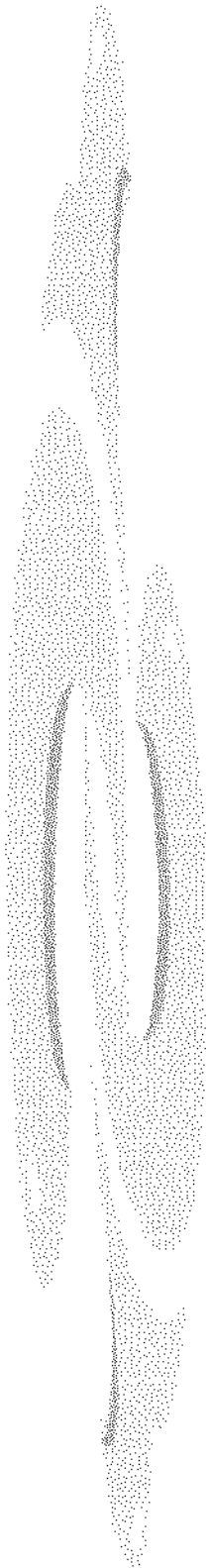
The study of the 1,0 dose evidenced on persistent and significative fall on the arterial blood pressure after two weeks of the treatment from $115 \pm 2,19 \text{ mmHg}$ to $94 \pm 4,29 \text{ mmHg}$. In relation of the 1,5 dose administration, this promoted one significant fall after first week on the 90 minutes of the treatment on the sodium clearance from $0,7 \pm 0,09$ to $0,27 \pm 0,04$ and after 120 minutes on the same week from $0,5 \pm 0,08$ to $0,22 \pm 0,04$.

The dose of the 1,0 CHET promoted progressively decreased arterial pressure from $134 \pm 2,88 \text{ mmHg}$ to $118 \pm 3,85 \text{ mmHg}$ ($P < 0.05$) during the first week of treatment, also a significant rise in creatinine clearance from $348,57 \pm 15,84 \mu\text{l min}^{-1} 100 \text{ g body weight}^{-1}$ to $544,81 \pm 84,87 \mu\text{l min}^{-1} 100 \text{ g body weight}^{-1}$ ($P < 0.05$), a fall in fractional

urinary sodium excretion from $0,23 \pm 0,02$ to $0,19 \pm 0,01$ % ($P < 0.05$) and sodium post-proximal fractional excretion from $18,09 \pm 1,25$ to $17,96 \pm 2,3$ % ($P < 0.05$), was observed when compared to the control group. These results were accompanied by a striking increase in fractional renal potassium excretion from $0,09 \pm 0,01$ % to $0,18 \pm 0,03$ % and from $0,09 \pm 0,01$ % to $0,16 \pm 0,02$ % during the first and second week of treatment when compared to the control group.

A significant antinatriuretic differences occurred during the first week of treatment despite an increased sodium filtered load in the CHET group. These results suggested that CHE decreased significantly blood pressure but attenuated the CHET-induced hypotension by promoting an additional decrease in tubule sodium excretion in post-proximal segments of nephrons. In conclusion, it was shown that *Vernonia* extract at a dose of 1,0 g/kg/day of the both extracts, is a potential vasodilatation agent in normotensive rats without any changes of renal autoregulation mechanisms.

However, the dose of 0,5 will be one direct influence on the tubular function, proximal individually, increased the sodium rejection on the segment.



8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-SATTAR, E.; MOSSA, J.S.; el-ASKARY, H.I. – Hirsutinolides from *Vernonia cinerascens*. *Pharmazie*, 55 (2): 144-145, 2000.
- ACHOLA, K.J.; MWANGI, J.W.; MUNENGE, R.W.; MWAURA, A.M. – Pharmacological activities of *Vernonia glabra*. *International Journal of Pharmacognosy*, 34(2): 141-144, 1996.
- ADEBOYE, J.O.; ASIJE, W.; AWE, S.O. – Diuretic and antidiuretic activity of the leaf extracts of *Vernonia cinerea* (Less) (Fam. Compositae). *Phytoterapy Research*, 11 (6): 454-456, 1997.
- ALLIOTA, G.; CAPASSO, G.; POLLIO, A.; STRUMIA, S.; De-SANTO, N.G. Joseph Jacob Plenck (1735-1807). *American Journal of Nephrology*, 14 (4-6): 377-382, 1994.
- ALMEIDA, E.R. - *Plantas Medicinais Brasileiras, Conhecimentos Populares e Científicos*. Recife, ed. Hemus, 1993. p.67-68.
- AMAT, A.G.; De BATTISTA, G.A.; ULIANA, R. - Diuretic activity of *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) aqueous extract. In: II CONGRESSO MUNDIAL DE PLANTAS AROMÁTICAS Y MEDICINALES PARA EL BIENESTAR DE LA HUMANIDAD, 1, Mendoza, 1997. *Anais. Mendoza*, 1997. p.357.
- ANDRADE, G.I.; SILVA, I.M.; FERNANDES, G.W.; SCATENA, V.L. – Aspectos biológicos da galhas de *Tomoplagia rudolphi* (Diptera:Tephritidae) em *Vernonia polyanthes* (Asteraceae). *Revista Brasileira de Biologia*, 55(4): 819-829, 1995.
- BARBOSA-FILHO, J.M. – Lignanas, neo-lignanas e seus análogos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. org. – *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Santa Catarina, Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000. p.471-488.
- BASUALDO, I.; ZARDINE, E.; ORTIZ, M. - Medicinal plants of Paraguay: Underground organs. *Economic Botany*, 45(1): 86-96, 1991.

- BEVEVINO, L.H.; VIEIRA, F.S.A.; CASSOLA, A.C.; SANIOTO, S.M.L. - Effect of crude extract of *Bredemeyera floribunda* Willd: I. Effect on arterial blood pressure and renal excretion in the rat. **Journal of Ethnopharmacology**, 43 (3): 197-201, 1994.
- BOAVENTURA, M.I.D.; BARRETO, R.F.; PELISSARI, R.; CAMPOS, C.A.C.; OLIVEIRA, I.R.; TOKARSKI, R.; WERKA, R.M.; TOKARKI, D.J.; MATTOS, J.K.A. - As plantas e como utilizá-las. In: _____ - **Remédios Caseiros**. 2^a ed. Brasília, Emater, 1988. p. 26.
- BOHLMANN, F.; ZDERO, C.; KING, R.M.; ROBINSON, H. - Hirsutinolides from *Vernonia polyanthes*. **Phytochemistry**, 22 (12): 2863-2864, 1983.
- BROD, J. & SIROTA, J.H. - The renal clearance of endogenous "creatinine" in man. **Journal of Clinical Investigation**, 27:645-653.
- CALDERÓN, C.P.; ASEFF, S.B.G.; FUENTES, L.B.; De RUIZ, R.L.; RUIZ, S.O. - Diuretic activity of *Alternanthera pungens* extracts in rats. **Bolletino Chimico Farmaceutico**, 138 (2) :74, 1999.
- CAMPOS, J.M. - Preparados composto vegetais, em pó. In: _____ - **O eterno plantio**. São Paulo, Cultrix/Pensamento, 1994. p. 165.
- CAMPOS, J.M. - Identificação botânica das flores. In: _____ - **Jornadas pelo mundo da cura**. São Paulo, Cultrix/Pensamento, 1995. p. 250.
- CARIBÉ, J. & CAMPOS, J.M. - Ervas medicinais. In: _____ - **Plantas que Ajudam o Homem**. São Paulo, Cultrix/Pensamento, 1991. p.124.
- COSTA-NETO, E.M. & OLIVEIRA, M.V.M. - The use of medicinal plants in the county of Tanquinho, state of Bahia, northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, 2 (2): 1-8, 2000.

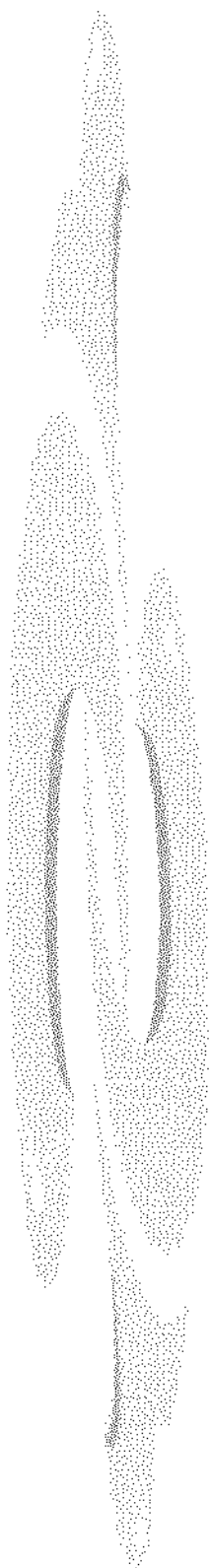
- CRUZ, G.C.; CUNHA, A.F.; CASTRO-CHAVES, C. – Efeitos renais do *Allium sativum* L. em ratos acordados. In: - IV JORNADA PAULISTA DE PLANTAS MEDICINAIS, 1, Ribeirão Preto, 1999. Anais. Ribeirão Preto, 1999. p.105.
- DI STASI, L.C., org. – **Plantas Medicinais: Arte e Ciência – Um guia de estudo interdisciplinar**. Botucatu, Editora UNESP, 1996. 230p.
- FERNANDEZ-ARCHE, M.; GARCIA-GIMENEZ, M.D.; SAENZ-RODRIGUEZ, M.T.; DE LA PUERTA VASQUEZ, R. – Effects of *Scrophularia frutescens* L. and *Scrophularia samuicifolia* subsp. *Samucifolia* Maire on renal excretion. *Plantes Medicinales et Phytotherapie*, 26 (4): 362-367, 1994.
- FRUTUOSO, V.S.; GURJÃO, M.R.; CORDEIRO, R.S.; MARTINS, M.A. – Analgesic and anti-ulcerogenic effects of a polar extract from leaves of *Vernonia condensata*. *Planta Médica*, 60 (1): 21-25, 1994.
- GALATI, E.M.; TROVATO, A.; KIRJAVAINEN, S.; FORESTIERI, A.M.; ROSSITTO, A.; MONFORTE, M.T. – Biological effects of hesperidin a *Citrus* flavonoid (III): antihypertensive and diuretic activity in rat. *Farmaco (Rome)*, 51 (3): 219-221, 1996.
- GARCIA, W.E.; GONTIJO, J.A.R.; FIGUEIREDO, J.F. – “Clearance” de lítio como método de avaliação do manuseio tubular de sódio em ratos acordados estudados em gaiolas metabólicas. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, 13, 3, 1991.
- GEMTCHÚJNICOV, I.R. – Ordem Asterales (Compositae) In: _____ - **Manual de taxonomia vegetal (plantas de interesse econômico, agrícolas, ornamentais e medicinais)**. São Paulo, Agronômica Ceres, 1976. p.272-277.
- GUYTON, A.C. – Long-term arterial blood pressure control: an analysis from animal experiments and computer and graphic models. *American Journal of Physiology*, 259: R865-877, 1990.
- GUYTON, A.C. & HALL, J.E. – Os rins e os líquidos corporais. In: _____ **Tratado de Fisiologia Médica**. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 1997. p.275-386.

- GUYTON, A.C.; COLEMAN, T.G.; COWLEY JR., A.W.; MANNING JR., R.D.; NORMAN, R.A.; FERGUSON, J.D. – A system analysis approach to understanding long-range arterial blood pressure control and hypertension. *Circulation Research*, 35: 159-176, 1974.
- HIGASHINO, H.; SUZUKI, A.; HISHIDA, M.; POOTAKHAN, K.; SIRISAARD, P. – Chronic hypotensive effect of two Siamese plant powders, *Imperata cylindrica* and *Phyllanthus emblica* on SHRSP. *Medical Journal of Kinki University*, 17(4): 31-34, 1992.
- HOLMSTEDT, B. & BRUHN, J.G. – Ethnopharmacology – a challenge. *Journal of Ethnopharmacology*, 8: 251-256, 1983.
- HOWELL, R.V. & MONTERO, G.U. – Actividade diuretica de la *Cecropia obtusifolia* (Moraceae) em ratas albinas. *Revista de Biologia Tropical*, 44 (1): 93-96, 1996.
- IOEN, C. – Methodologie d'analyse des produits vegetaux. Romênia, 1982. p. 481-516.
- JORGE, L.I.F.; PEREIRA, V.; SILVA, A.M. – Identificação histológica das principais compostas brasileiras de emprego medicinal. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 51(1/2): 47-51, 1991.
- KASONIA, K. – Preliminary screening of plant extracts used in respiratory pathology in Kinki/Zaire on isolated guinea pigs rings trachea. *Belgian Journal of Botany*, 128 (2): 167-175, 1995.
- KISSMAN, K.G. & GROTH, D. – *Vernonia polyanthes* Less. In: _____. *Plantas infestantes e nocivas*. São Paulo, Tomo II. BASF Brasileira S.A., 1992. p.378-379.
- KOOMANS, H.A. – Evaluation of lithium clearance as a marker of proximal tubule sodium handling. *Kidney International*, 36: 2, 1989.
- KOTOWICZ, C.; BARDÓN, A.; CATALÁN, C.A.N.; CERDA-GARCÍA-ROJAS, C.M.; JOSEPH-NATHAN, P. – *Phytochemistry*, 47(3): 425-428, 1998.

- LOVENBERG, W. – Techniques for the measurement of blood pressure. *Hypertension*, (suppl): 15-16, 1987.
- MALUF, A.M. – Effects of temperature and light on seed germination in two populations of *Vernonia polyanthes* (Asteraceae). *Hochnea*, 20(1/2): 133-137, 1993.
- MASUMIYA, H.; SAITOH, T.; TANAKA, Y.; HORIE, S.; AIMI, N.; TAKAYAMA, H.; TANAKA, H.; SHIGENOBU, K. – Effects of hirsutine and dihydrocorynantheine on the action potentials of sino-atrial node, atrium and ventricle. *Life Sciences*, 65(22): 2333-2341, 1999.
- MATTOS, J.K.A. & Das GRACAS, M.A. – Coleção viva de ervas medicinais na Universidade de Brasília. Primeiro Ano de Observações. *Ciência e Cultura* (supl) 33: 96-106, 1980.
- NAVARRO, E.; ALONSO, J.; RODRIGUEZ, R.; TRUJILLO, J.; BOADA, J. – Diuretic action of an aqueous extract of *Lepidium latifolium* L. *Journal Ethnopharmacology*, 41(1-2): 65-69, 1994.
- OZAKI, Y. – Pharmacological studies of indole alkaloids obtained from domestic plants, *Uncaria rhynchophylla* Miq. and *Amsonia elliptica* Roem. et Schult. *Nippon Yakurigaku Zasshi*, 94(1): 17-26, 1989.
- OZAKI, Y. – Vasodilative effects of indole alkaloids obtained from domestic plants, *Uncaria rhynchophylla* Miq. and *Amsonia elliptica* Roem. et Schult. *Nippon Yakurigaku Zasshi*, 95(2): 47-54, 1990.
- PENA, M. – *Dicionário brasileiro de plantas medicinais: descrição das plantas medicinais indígenas e das exóticas aclimatadas no Brasil*. 3ª ed. Rio de Janeiro, ed. Kosmos, 1946. p.376.
- PEREIRA, A.S.; PINTO, A.C.; CARDOSO, J.N.; NETO, F.R.A.; RAMOS, M.F.S.; DELLAMORA-ORTIZ, G.M.; SANTOS, E.P. – Application of high temperature high resolution gas chromatography to crude extracts of propolis. *Journal of High Resolution Chromatography*, 21 (7): 396-400, 1998.

- von POSER, G.L. & MENTZ, L.A. – Diversidade biológica e sistemas de classificação. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. org. – **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Santa Catarina, Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000. p.61-74.
- RASSINI, J.B. & COELHO, R.R. – Controle químico de assa-peixe (*Vernonia polyanthes*) em pastagens. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 23(6): 871-876, 1994.
- REIS, M.S. & MARIOT, A. – Diversidade natural e aspectos agrônômicos de plantas medicinais. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. org. – **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Santa Catarina, Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000. p.39-60.
- RIBEIRO, R.A., FIUZA de MELO, M.M.R.; BARROS, F.; GOMES, C.; TROLIN, G. – Acute antihypertensive effect in conscious rats produced by some medicinal plants used in the state of São Paulo. **Journal of Ethnopharmacology**, 15: 261-270, 1986.
- ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. – **Farmacognosia e Farmacobiotecnologia**. Baltimore, Editorial Premier, 1998. 372p.
- SACRAMENTO, H.T.; LIMA, A.M.; LIMA, A.L.G.; GONÇALVES, E.M.; MARTINELLI, S.M.; CALIMAN, M.P.; ORLETI, A.; ORLET, S.; DINIZ, M.C.L.; AMORIN, C.P.; RAVANI, D.G. – Fitoterapia: uma alternativa para a saúde pública. In: XIV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 1996. **Anais**. 1996. p. 59.
- SCATENA, V.L. – Estudo morfo-anatômico de plântulas e de órgãos vegetativos aéreos e ensaio farmacológico de *Vernonia polyanthes* Less. (Compositae). Rio Claro, 1983. (Tese – Mestrado – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”).
- SILVA, I.; FRANCO, S.L.; CONEGERO, C.I. – **Noções sobre o organismo humano e utilização de plantas medicinais**. 2 ed. Cascavel, Assoeste, 1995. 203p.

- SILVA, I.M.; ANDRADE, G.I.; FERNANDES, G.W.; LEMOS FILHO, J.P. – Parasitic relationships between a gall-forming insect *Tomoplagia rudolphi* (Diptera: Tephritidae) and its host plant (*Vernonia polyanthes*, Asteraceae). *Annals of Botany*, 78(1): 45-48, 1996.
- SILVEIRA, R.R.; RÚBIO, C.R.; ALVES, M.J.Q.F. – Modificações da diurese e da pressão arterial em ratos Wistar anestesiados, após administração oral do infuso de assa-peixe (*Vernonia polyanthes* Less.). *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 2(2): 31-35, 2000.
- SOUZA FILHO, A.P.S.; RODRIGUES, L.R.A.; RODRIGUES, T.J.D. – Allelopathic potential of three forage legumes on three pasture weeds. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 32(2): 165-170, 1997.
- THOMSEN, K.; HOLSTEIN-RATHLOU, N.H.; LEYSSAC, P.P – Comparison of three measures of proximal tubular reabsorption: lithium clearance, occlusion time, and micropuncture. *American Physiological Society*, 241: F348-F356, 1981.
- THOMSEN, K. & SHIRLEY, D.G. – The validity of lithium clearance as an index of sodium and water delivery from the proximal tubules. *Nephron*, 77: 125-138, 1997.
- VAN DEN BERG, M.E. – Contribuição à flora medicinal do Estado de Mato Grosso. *Ciência e Cultura*, (supl. 33) : 163-170, 1980.
- WILLIAMSON, E.M.; OKPAKO, D.T.; EVANS, F.J. - The respiratory system – In: _____ *Pharmacological methods in phytoterapy research*, vol. 1, England. British Library, 1997. p. 113-129.
- WRIGHT, F.S. & GIEBISCH, G. – Regulation of potassium excretion. In: *The Kidney Physiology and Pathophysiology*. Raven Press Ltda, New York, 1992, p.2209-2247.



9. ANEXOS

Tabela 1- Clearance de Creatinina
1a semana de tratamento

Tempo (min)	CCr ($\mu\text{l/min/100g}$) EBA 0,5 g/kg								
	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
	19			9			8		
30		315,89	27,7		289,58	27,68		355,97	29,18
60		300,42	29,35		282,39	38,02		362,42	32,68
90		252,89	21,83		335,26	38,10		311,09	25,47
120		346,47	32,89		290,91	48,95		337,77	36,04

Tempo (min)	CCr ($\mu\text{l/min/100g}$) EBA 1,0g/kg								
	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
	18			9			10		
30		205,18	25,83		235,12	23,16		230,69	29,38
60		175,91	23,84		238,28	25,46		215,06	21,09
90		211,61	32,82		208,31	31,85		222,74	25,36
120		200,61	25,73		223,94	23,08		229,47	22,00

Tempo (min)	CCr ($\mu\text{l/min/100g}$) EBA 1,5 g/kg								
	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
	12			8			10		
30		424,73	40,68		348,08	59,11		382,96	30,76
60		358,28	38,09		305,54	21,5		340,63	31,15
90		360,75	39,09		260,36	26,3		226,7	27,7
120		334,8	30,3		274,07	57,4		202,32	22,91

Tempo (min)	CCr ($\mu\text{l/min/100g}$) EBAT 1,0 g/kg								
	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
	18			7			9		
30		348,57	15,84		402,02	39,93		544,8	84,87
60		292,08	28,98		305,69	26,16		442,58	60,8
90		269,39	13,99		176,68	15,73		347,64	55,22
120		298,96	15,37		256,89	13,57		327,15	54,04

Tabela 2- Clearance de creatinina
2a semana de tratamento

Tempo (min)	CCr ($\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}$)			EBA 0,5 g/kg		
	BASAL			CO		
	n	X	EPM	n	X	EPM
	19			7		6
30		315,89	27,70		304,77	41,79
60		300,42	29,35		334,37	70,73
90		252,89	21,83		248,42	29,38
120		346,47	32,89		353,83	61,60

Tempo (min)	CCr ($\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}$)			EBA 1,0 g/kg		
	BASAL			CO		
	n	X	EPM	n	X	EPM
	18			10		7
30		205,18	25,83		268,39	40,51
60		175,91	23,84		225,50	31,46
90		211,61	32,82		230,16	36,95
120		200,61	25,73		244,19	41,08

Tempo (min)	CCr ($\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}$)			EBA 1,5 g/kg		
	BASAL			CO		
	n	X	EPM	n	X	EPM
	12			8		9
30		424,73	40,68		351,17	39,95
60		358,28	38,09		357,26	32,03
90		360,75	39,09		233,70	41,42
120		334,80	30,30		238,87	41,30

tempo (min)	CCr ($\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}$)			EBAT 1,0 g/kg		
	BASAL			CO		
	n	X	EPM	n	X	EPM
	18			7		10
30		348,57	15,84		290,4	23,4
60		292,08	28,98		323,93	45,62
90		269,39	13,99		231,46	32,23
120		298,96	15,37		232,20	31,98

Tabela 1' - Clearance de Creatinina
1a e 2a semanas de tratamento

CCr ($\mu\text{l/min/100g}$) EBA 0,5 g/kg									
ASC	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
1a	19	10485	1415	9	14126	1238,0	8	15685	2890,9
2a	19	10485	1415	7	10704	1930,6	6	17113	4350,1

CCr ($\mu\text{l/min/100g}$) EBA 1,0 g/kg									
ASC	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
1a	18	9044,2	1326,5	9	10374	1751,0	10	9728,7	1388,7
2a	18	9044,2	1326,5	10	10733	1409,7	7	9996,4	2010,3

CCr ($\mu\text{l/min/100g}$) EBA 1,5 g/kg									
ASC	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
1a	12	19247	2791,4	8	15212	3592,9	10	19404	1740,4
2a	12	19247	2791,4	8	17515	1680,3	9	20140	2472,7

CCr ($\mu\text{l/min/100g}$) EBAT 1,0 g/kg									
ASC	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
1a	18	14405	1178,8	7	14972	2197,7	9	25330	3703,4
2a	18	14405	1178,8	7	14925	1937,4	10	19016	1963,8

Tabela 3- Clearance de lítio
1a semana de tratamento

CLi (µl/min/100g) EBA 0,5 g/kg									
tempo (min)	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
	19			9			8		
30		56,72	5,27		64,93	6,49		78,39	9,31
60		51,06	5,37		64,08	6,29		78,52	6,75
90		44,10	4,10		72,18	7,92		65,23	4,02
120		51,26	5,41		65,16	6,72		63,28	6,68

CLi (μl/min/100g) EBA 1,0 g/kg									
tempo (min)	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
	18			9			10		
30		47,68	4,72		50,20	3,80		54,87	6,19
60		40,98	4,11		51,97	6,90		48,15	3,32
90		42,52	4,78		38,78	6,70		44,87	4,20
120		38,44	3,90		42,00	5,71		44,25	3,42

CLi ($\mu\text{l/min/100g}$) EBA 1,5 g/kg									
tempo	BASAL			CO			EBA		
(min)	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
	12			8			10		
30		78,33	7,86		63,78	9,85		64,58	5,48
60		72,23	4,73		54,23	2,82		60,37	3,71
90		68,35	6,16		46,23	4,79		35,57	3,74
120		63,32	4,96		53,88	11,12		26,91	2,63

CLi (μl/min/100g) EBAT 1,0 g/kg									
tempo (min)	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
	18			7			9		
30		63,37	5,94		79,71	12,41		94,42	17,26
60		56,37	6,74		60,76	8,29		92,98	19,76
90		49,44	4,17		30,77	3,18		64,70	10,12
120		47,29	3,80		39,89	3,79		65,00	12,43

Tabela 4- Clearance de lítio
2ª semana de tratamento

CLi (μ/min/100g) EBA 0,5 g/kg									
Tempo (min)	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
	19			7			6		
30		56,72	5,27		64,53	8,20		92,26	18,26
60		51,06	5,37		66,84	9,07		60,85	7,25
90		44,10	4,10		50,81	5,30		67,79	8,07
120		51,26	5,41		72,94	11,42		54,05	7,00

CLi (μl/min/100g) EBA 1,0 g/kg									
tempo (min)	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
	18			10			7		
30		47,68	4,72		58,70	4,86		52,68	8,93
60		40,98	4,11		48,68	4,94		45,41	6,89
90		42,52	4,78		40,45	3,66		41,07	7,34
120		38,44	3,90		48,63	5,48		37,60	6,96

CLi (μl/min/100g) EBA 1,5 g/kg									
tempo (min)	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
	12			8			9		
30		78,33	7,86		72,79	7,60		77,80	7,48
60		72,23	4,73		68,57	4,04		65,80	7,07
90		68,35	6,16		43,72	5,79		39,94	3,69
120		63,32	4,96		39,84	5,25		40,84	4,13

CLi (µl/min/100g) EBAT 1,0 g/kg									
tempo (min)	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
	18			7			10		
30		63,37	5,94		54,40	4,34		69,91	12,85
60		56,37	6,74		60,31	8,05		68,26	11,49
90		49,44	4,17		36,82	6,87		57,16	11,05
120		47,29	3,80		35,86	6,49		60,11	9,98

Tabela 2' - Clearance de lítio
1a e 2a semana de tratamento

CLi (µl/min/100g) EBA 0,5 g/kg									
ASC	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
1a	19	2249,5	272,45	9	3103,4	395,40	8	3816,9	574,20
2a	19	2249,5	272,45	7	2183,2	448,18	6	4194,8	956,92

CLi (µl/min/100g) EBA 1,0 g/kg									
ASC	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
1a	18	2205,7	238,72	9	2338,5	347,93	10	2445,3	258,73
2a	18	2205,7	238,72	10	2381,4	296,06	7	2482,9	419,79

CLi (µl/min/100g) EBA 1,5 g/kg									
ASC	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
1a	12	3717,9	563,81	8	2502,8	690,37	10	3604,6	222,21
2a	12	3717,9	563,81	8	3759,8	330,43	9	3668,5	436,75

CLi (µl/min/100g) EBAT 1,0 g/kg									
ASC	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
1a	18	2947,2	290,71	7	3341,9	631,91	9	4637,8	993,22
2a	18	2947,2	290,71	7	2932,5	296,97	10	3154,9	771,88

Tabela 5- Clearance de sódio
1a semana de tratamento

CNa ($\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}$) EBA 0,5 g/kg									
tempo (min)	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
	19			9			8		
30		0,58	0,08		0,44	0,07		0,65	0,12
60		0,49	0,08		0,49	0,10		0,45	0,06
90		0,42	0,06		0,61	0,17		0,41	0,13
120		0,49	0,08		0,61	0,07		0,36	0,07

CNa ($\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}$) EBA 1,0 g/kg									
tempo (min)	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
	18			9			10		
30		0,63	0,06		0,44	0,04		0,68	0,11
60		0,47	0,04		0,46	0,07		0,40	0,05
90		0,44	0,06		0,34	0,03		0,32	0,06
120		0,40	0,05		0,43	0,06		0,37	0,05

CNa ($\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}$) EBA 1,5 g/kg									
tempo (min)	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
	12			8			10		
30		0,82	0,16		0,62	0,07		0,68	0,13
60		0,62	0,11		0,53	0,15		0,59	0,10
90		0,70	0,09		0,44	0,13		0,27	0,04
120		0,50	0,08		0,46	0,17		0,22	0,04

CNa ($\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}$) EBAT 1,0 g/kg									
tempo (min)	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
	18			7			9		
30		0,83	0,11		0,64	0,09		0,95	0,11
60		0,68	0,12		0,33	0,04		0,58	0,14
90		0,47	0,06		0,14	0,01		0,38	0,07
120		0,40	0,05		0,27	0,01		0,44	0,12

Tabela 6- Clearance de sódio
2a semana de tratamento

CNa (µl/min/100g) EBA 0,5 g/kg									
tempo (min)	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
	19			7			6		
30		0,58	0,08		0,67	0,11		1,40	0,36
60		0,49	0,08		0,67	0,10		0,77	0,18
90		0,42	0,06		0,46	0,08		0,62	0,16
120		0,49	0,08		0,67	0,10		0,41	0,07

CNa (µl/min/100g) EBA 1,0 g/kg									
tempo (min)	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
	18			10			7		
30		0,63	0,06		0,63	0,07		0,68	0,09
60		0,47	0,04		0,47	0,09		0,42	0,05
90		0,44	0,06		0,41	0,08		0,33	0,06
120		0,40	0,05		0,60	0,14		0,40	0,09

CNa (µl/min/100g) EBA 1,5 g/kg									
tempo (min)	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
	12			8			9		
30		0,82	0,16		0,94	0,13		0,80	0,16
60		0,62	0,11		0,76	0,16		0,74	0,18
90		0,70	0,09		0,48	0,12		0,39	0,07
120		0,50	0,08		0,41	0,10		0,37	0,06

CNa (µl/min/100g) EBAT 1,0 g/kg									
tempo (min)	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
	18			7			10		
30		0,83	0,11		0,39	0,10		0,86	0,25
60		0,68	0,12		0,43	0,08		0,56	0,10
90		0,47	0,06		0,26	0,06		0,46	0,10
120		0,40	0,05		0,25	0,08		0,50	0,10

Tabela 3'- Clearance de sódio
1a e 2a semanas de tratamento

ASC	CNa ($\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}$) EBA 0,5 g/kg								
	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
1a	19	24,34	4,49	9	21,70	8,47	8	29,05	5,84
2a	19	24,34	4,49	7	23,76	6,50	6	65,18	20,92

ASC	CNa ($\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}$) EBA 1,0 g/kg								
	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
1a	18	28,21	2,94	9	17,75	3,68	10	25,08	4,52
2a	18	28,21	2,94	10	18,64	3,48	7	24,96	6,95

ASC	CNa ($\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}$) EBA 1,5 g/kg								
	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
1a	12	41,68	7,09	8	26,87	4,33	10	36,15	7,00
2a	12	41,68	7,09	8	46,89	6,52	9	41,25	9,81

ASC	CNa ($\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}$) EBAT 1,0 g/kg								
	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
1a	18	41,13	5,68	7	21,47	3,97	9	38,68	5,21
2a	18	41,13	5,68	7	20,87	3,87	10	34,37	9,66

Tabela 7- Fração de excreção de potássio
1a semana de tratamento

tempo (min)	FEK (%) EBA			0,5 g/kg					
	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	N	X	EPM	n	X	EPM
	19			9			8		
30		0,07	0,01		0,09	0,01		0,08	0,01
60		0,07	0,01		0,11	0,02		0,09	0,01
90		0,06	0,01		0,09	0,02		0,07	0,01
120		0,06	0,01		0,09	0,01		0,07	0,01

tempo (min)	FEK (%) EBA 1,0 g/kg								
	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
	18			9			10		
30		0,17	0,02		0,13	0,01		0,15	0,01
60		0,19	0,04		0,11	0,01		0,15	0,02
90		0,14	0,02		0,09	0,01		0,12	0,01
120		0,12	0,01		0,08	0,01		0,11	0,01

tempo (min)	FEK (%) EBA 1,5 g /kg								
	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	N	X	EPM	n	X	EPM
	12			8			10		
30		0,06	0,01		0,11	0,01		0,09	0,01
60		0,06	0,01		0,11	0,02		0,10	0,01
90		0,06	0,01		0,09	0,01		0,08	0,01
120		0,06	0,01		0,08	0,01		0,06	0,01

tempo (min)	FEK (%) EBA 1,0 g/kg								
	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
	18			7			9		
30		0,09	0,01		0,18	0,02		0,18	0,02
60		0,10	0,01		0,16	0,01		0,21	0,02
90		0,08	0,01		0,13	0,02		0,20	0,03
120		0,06	0		0,09	0,01		0,18	0,03

Tabela 8- Fração de excreção de potássio
2a semana de tratamento

tempo (min)	FEK (%) EBA			0,5 g/kg					
	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
	19			7			6		
30		0,07	0,01		0,07	0,01		0,07	0,01
60		0,07	0,01		0,07	0,01		0,08	0,01
90		0,06	0,01		0,06	0,01		0,05	0,01
120		0,06	0,01		0,06	0,01		0,06	0,01

tempo (min)	FEK (%) EBA 1,0 g/kg								
	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
	18			10			7		
30		0,17	0,02		0,13	0,02		0,13	0,02
60		0,19	0,04		0,12	0,01		0,13	0,01
90		0,14	0,02		0,09	0,01		0,10	0,01
120		0,12	0,01		0,10	0,02		0,13	0,03

tempo (min)	FEK (%) EBA 1,5 g/kg								
	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
	12			8			10		
30		0,06	0,01		0,12	0,01		0,09	0,01
60		0,06	0,01		0,12	0,02		0,09	0,01
90		0,06	0,01		0,09	0,01		0,07	0,01
120		0,06	0,01		0,07	0,01		0,06	0,01

tempo (min)	FEK (%) EBAT 1,0 g/kg								
	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
	18			7			10		
30		0,09	0,01		0,16	0,01		0,16	0,02
60		0,10	0,01		0,18	0,02		0,20	0,03
90		0,08	0,01		0,12	0,02		0,20	0,03
120		0,06	0		0,09	0,01		0,14	0,02

**Tabela 4' – Fração de excreção de
potássio
1a e 2a semanas de tratamento**

ASC	FEK (%) EBA			0,5 /kg					
	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
	19			9			8		
		3,52	0,43		4,23	0,89		3,84	0,50
	19			7			6		
		3,52	0,43		3,12	0,41		3,20	0,92

ASC	FEK (%) EBA 1,0 g/kg								
	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
	18			9			10		
		9,74	1,48		6,39	0,60		7,60	0,96
	18			10			7		
		9,74	1,48		5,81	1,05		5,15	0,94

ASC	FEK (%) EBA 1,5 g /kg								
	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X0	EPM
	12			8			10		
		2,54	0,5		5,83	1,15		5,16	0,90
	12			8			10		
		2,54	0,5		6,77	0,98		4,60	0,94

ASC	FEK (%) EBAT 1,0 g/kg								
	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
	18			7			9		
		5,23	0,58		9,96	1,01		9,38	1,11
	18			7			10		
		5,23	0,58		9,45	1,25		10,52	1,53

Tabela 9- Fração de excreção de sódio

1a semana de tratamento

FENa (%) EBA 0,5 g/kg								
tempo	BASAL			CO			EBA	
(min)	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X EPM
	19			9			8	
30		0,19	0,03		0,17	0,03		0,18 0,03
60		0,17	0,02		0,24	0,09		0,13 0,03
90		0,17	0,02		0,22	0,09		0,14 0,06
120		0,16	0,02		0,33	0,09		0,12 0,03

FENa (%) EBA 1,0 g/kg								
tempo	BASAL			CO			EBA	
(min)	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X EPM
	18			9			10	
30		0,36	0,03		0,20	0,02		0,29 0,03
60		0,34	0,06		0,21	0,03		0,19 0,02
90		0,28	0,04		0,21	0,03		0,15 0,02
120		0,22	0,02		0,20	0,02		0,17 0,02

FENa (%) EBA 1,5 g/kg								
tempo	BASAL			CO			EBA	
(min)	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X EPM
	12			8			10	
30		0,22	0,06		0,22	0,04		0,20 0,05
60		0,19	0,04		0,18	0,05		0,18 0,03
90		0,22	0,04		0,16	0,03		0,13 0,02
120		0,17	0,04		0,16	0,03		0,12 0,02

FENa (%) EBAT 1,0 g/kg								
tempo	BASAL			CO			EBA	
(min)	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X EPM
	18			7			9	
30		0,23	0,02		0,17	0,03		0,19 0,01
60		0,22	0,03		0,11	0,01		0,12 0,01
90		0,18	0,02		0,08	0,01		0,11 0,01
120		0,13	0,02		0,10	0,01		0,14 0,02

Tabela 10- Fração de excreção de sódio
2a semana de tratamento

FENa (%) EBA				0,5 g/kg					
tempo (min)	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
	19			7			6		
30		0,19	0,03		0,23	0,03		0,35	0,04
60		0,17	0,02		0,24	0,03		0,34	0,10
90		0,17	0,02		0,21	0,04		0,19	0,03
120		0,16	0,02		0,20	0,02		0,19	0,06

FENa (%) EBA 1,0 g/kg									
tempo (min)	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
	18			10			7		
30		0,36	0,03		0,28	0,04		0,34	0,03
60		0,34	0,06		0,23	0,03		0,25	0,03
90		0,28	0,04		0,21	0,04		0,17	0,02
120		0,22	0,02		0,29	0,08		0,24	0,04

FENa (%) EBA 1,5 g /kg									
tempo (min)	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
	12			8			9		
30		0,22	0,06		0,28	0,03		0,19	0,03
60		0,19	0,04		0,23	0,05		0,20	0,04
90		0,22	0,04		0,20	0,03		0,16	0,03
120		0,17	0,04		0,18	0,03		0,14	0,02

FENa (%) EBAT 1,0 g/kg									
tempo (min)	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
	18			7			10		
30		0,23	0,02		0,15	0,05		0,19	0,06
60		0,22	0,03		0,19	0,06		0,13	0,02
90		0,18	0,02		0,12	0,04		0,14	0,03
120		0,13	0,02		0,12	0,04		0,15	0,03

Tabela 5' - Fração de excreção de sódio

1a e 2a semanas de tratamento

FENa (%) EBA 0,5 g/kg									
ASC	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	N	X	EPM
	19			9			8		
		9,96	1,43		9,67	4,31		8,17	1,62
	19			7			6		
		9,96	1,43		11,08	2,33		17,98	3,52

FENa (%) EBA 1,0 g/kg									
ASC	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
	18			9			10		
		19,31	2,57		9,49	1,88		11,51	1,45
	18			10			7		
		19,31	2,57		9,71	2,00		12,10	2,24

FENa (%) EBA 1,5 g/kg									
ASC	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
	12			8			10		
		11,32	2,13		9,98	2,92		10,02	2,35
	12			8			9		
		11,32	2,13		13,09	2,59		10,43	2,39

FENa (%) EBAT 1,0 g/kg									
ASC	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
	18			7			9		
		12,98	1,43		6,43	1,25		6,53	1,11
	18			7			10		
		12,98	1,43		8,46	2,88		7,49	1,92

Tabela 11- Fração de excreção proximal de sódio
1ª semana de tratamento

FEPNa (%) EBA 0,5 g/kg									
tempo (min)	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
	19			9			8		
30		18,25	1,20		22,77	1,67		22,08	1,86
60		17,2	0,82		24,68	2,02		22,13	1,51
90		18,00	1,76		22,23	1,98		21,39	1,11
120		15,09	0,95		28,18	4,67		19,38	1,56

FEPNa (%) EBA 1,0 g/kg									
tempo (min)	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
	18			9			10		
30		25,63	2,39		22,62	1,98		24,61	1,38
60		28,46	5,01		21,33	1,38		23,90	1,74
90		23,43	2,02		19,26	2,03		21,10	1,26
120		20,51	1,36		18,41	1,07		20,18	1,43

FEPNa (%) EBA 1,5 g/kg									
tempo (min)	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
	12			8			10		
30		19,64	2,40		19,67	1,66		17,25	1,24
60		22,35	2,14		18,45	1,45		18,55	1,34
90		20,43	2,01		18,47	1,93		16,43	1,64
120		20,51	2,30		22,05	4,61		14,24	1,47

FEPNa (%) EBAT 1,0 g/kg									
tempo (min)	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
	18			7			9		
30		18,09	1,25		19,22	1,20		17,96	2,30
60		19,35	1,18		19,67	1,81		19,22	2,04
90		18,35	1,10		17,78	1,66		18,51	1,74
120		15,99	1,13		15,60	1,35		19,52	1,38

Tabela 12- Fração de excreção proximal de sódio
2a semana de tratamento

FEPNa (%) EBA 0,5 g/kg									
tempo (min)	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
	19			7			6		
30		18,25	1,20		21,60	1,33		23,67	2,13
60		17,2	0,82		22,70	2,10		25,52	2,50
90		18,00	1,76		21,88	2,41		21,73	1,46
120		15,09	0,95		21,73	1,51		21,10	1,57

FEPNa (%) EBA 1,0 g/kg									
tempo (min)	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
	18			10			7		
30		25,63	2,39		24,28	1,90		25,33	1,97
60		28,46	5,01		23,30	1,85		24,74	1,84
90		23,43	2,02		20,10	2,03		20,90	1,71
120		20,51	1,36		22,41	2,40		21,24	1,29

FEPNa (%) EBA 1,5 g/kg									
tempo (min)	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
	12			8			9		
30		19,64	2,40		21,22	1,59		18,28	1,5
60		22,35	2,14		20,11	1,55		17,19	1,52
90		20,43	2,01		19,90	1,93		16,08	1,22
120		20,51	2,30		17,89	1,57		15,25	1,19

FEPNa (%) EBAT 1,0 g/kg									
tempo (min)	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
	18			7			10		
30		18,09	1,25		18,89	0,87		15,41	1,93
60		19,35	1,18		19,26	1,41		16,17	1,96
90		18,35	1,10		15,47	1,15		17,36	2,01
120		15,99	1,13		15,09	1,29		17,31	1,78

Tabela 6' - Fração de excreção proximal de sódio
1a e 2a semanas de tratamento

FEPNa (%) EBA 0,5 g/kg									
tempo	BASAL			CO			EBA		
ASC	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
	19			9			8		
		924,31	77,35		969,27	79,44		1096,0	81,63
	19			7			6		
		924,31	77,35		1007,2	121,33		1177,8	106,41

ASC	FEPNa (%) EBA 1,0 g/kg								
	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
	18			9			10		
		1402,4	200,4		1067,6	113,26		1180,3	71,85
	18			10			7		
		1402,4	200,4		1022,1	92,39		1173,7	118,86

FEPNa (%) EBA 1,5 g /kg									
ASC	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
	12			8			10		
		949,66	99,39		710,96	121,03		925,74	61,58
	12			8			9		
		949,66	99,39		1031,60	85,68		859,97	74,83

FEPNa (%) EBAT 1,0 g/kg									
ASC	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
	18			7			9		
		954,17	78,6		998,19	109,63		792,55	139,00
	18			7			10		
		954,17	78,6		929,29	47,21		689,42	102,66

Tabela 13- Fração de excreção pós-proximal de sódio
1a semana de tratamento

FEPPNa (%) EBA 0,5 g/kg									
Tempo	BASAL			CO			EBA		
(min)	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
	19			9			8		
30		1,01	0,09		0,72	0,10		0,80	0,11
60		0,98	0,11		0,87	0,27		0,58	0,08
90		1,05	0,15		0,91	0,30		0,61	0,20
120		1,04	0,13		1,02	0,14		0,58	0,10

FEPPNa (%) EBA 1 ,0 g/kg									
tempo	BASAL			CO			EBA		
(min)	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
	18			9			10		
30		1,46	0,13		0,93	0,12		1,18	0,08
60		1,22	0,12		1,01	0,17		0,81	0,07
90		1,14	0,13		1,12	0,19		0,69	0,08
120		1,05	0,08		1,10	0,12		0,81	0,09

FEPPNa (%) EBA 1,5 g /kg									
tempo	BASAL			CO			EBA		
(min)	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
	12			8			10		
30		1,05	0,15		1,07	0,13		1,15	0,22
60		0,84	0,11		0,93	0,22		0,96	0,15
90		1,04	0,13		0,90	0,18		0,78	0,09
120		0,76	0,09		0,83	0,18		0,85	0,15

FEPPNa (%) EBAT 1,0 g/kg									
tempo	BASAL			CO			EBA		
(min)	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
	18			7			9		
30		1,27	0,08		0,92	0,17		1,18	0,17
60		1,22	0,18		0,59	0,08		0,70	0,09
90		1,01	0,12		0,48	0,06		0,61	0,06
120		0,86	0,10		0,70	0,06		0,72	0,11

Tabela 14- Fração de excreção pós-proximal de sódio
2ª semana de tratamento

FEPPNa (%) EBA 0,5 g/kg									
tempo (min)	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
	19			7			6		
30		1,01	0,09		1,05	0,11		1,60	0,27
60		0,98	0,11		1,03	0,07		1,37	0,31
90		1,05	0,15		0,89	0,13		0,89	0,16
120		1,04	0,13		0,95	0,08		0,90	0,23

FEPPNa (%) EBA 1,0 g/kg									
tempo (min)	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
	18			10			7		
30		1,46	0,13		1,09	0,09		1,34	0,05
60		1,22	0,12		0,95	0,11		0,99	0,08
90		1,14	0,13		1,06	0,22		0,85	0,11
120		1,05	0,08		1,23	0,26		1,08	0,17

FEPPNa (%) EBA 1,5 g/kg									
tempo (min)	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
	12			8			9		
30		1,05	0,15		1,35	0,17		1,02	0,18
60		0,84	0,11		1,11	0,20		1,10	0,21
90		1,04	0,13		1,02	0,12		0,97	0,16
120		0,76	0,09		1,00	0,14		0,88	0,09

FEPPNa (%) EBAT 1,0 g/kg									
tempo (min)	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
	18			7			10		
30		1,27	0,08		0,78	0,25		1,10	0,22
60		1,22	0,18		0,92	0,28		0,89	0,11
90		1,01	0,12		0,75	0,20		0,81	0,11
120		0,86	0,10		0,76	0,23		0,87	0,13

**Tabela 7' - Fração de excreção pós-proximal de
sódio
1a e 2a semanas de tratamento**

FEPPNa (%) EBA 0,5 g/kg									
ASC	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
	19			9			8		
		45,83	5,75		32,27	16,58		33,67	5,91
	19			7			6		
		45,83	5,75		46,34	7,50		75,43	16,40

FEPPNa (%) EBA 1,0 g/kg									
ASC	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
	18			9			10		
		67,3	7,9		42,30	9,99		43,91	4,83
	18			10			7		
		67,3	7,9		37,71	6,26		46,52	9,50

FEPPNa (%) EBA 1,5 g/kg									
ASC	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
	12			8			10		
		53,39	6,64		49,76	11,56		48,35	9,91
	12			8			9		
		53,39	6,64		59,64	12,36		53,32	13,03

FEPPNa (%) EBAT 1,0 g/kg									
ASC	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
	18			7			9		
		66,13	8,38		31,22	5,53		42,30	7,24
	18			7			10		
		66,13	8,38		39,51	12,19		46,58	7,59

Tabela 15- Volume urinário

VU ($\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}$) EBA 0,5 g/kg									
tempo (dias)	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
Basal	24	3,22	0,2						
1				14	3,17	0,30	12	3,24	0,35
8				11	3,08	0,28	10	3,80	0,43

VU ($\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}$) EBA 1,0 g/kg									
tempo (dias)	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
basal	17	5,63	0,61						
1				9	4,36	0,25	7	4,99	0,85
8				8	4,68	0,47	10	4,00	0,40

VU ($\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}$) EBA 1,5 g/kg									
tempo (dias)	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
basal	20	3,96	0,34						
1				11	3,08	0,49	13	4,17	0,42
8				10	3,67	0,97	12	4,50	0,50

VU ($\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}$) EBAT 1,0 g/kg									
tempo (dias)	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
basal	21	4,84	0,47						
1				12	4,22	0,43	11	3,90	0,41
8				11	4,11	0,42	12	3,61	0,44

Tabela 16- Carga excretada de potássio

UKV (mEq/min/100g) EBA 0,5 g/kg									
tempo (dias)	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
basal	24	365,14	17,29						
1				14	378,06	36,30	12	315,70	46,51
8				11	334,61	28,14	10	358,58	41,43

UKV (mEq/min/100g) EBA 1,0 g/kg									
tempo (dias)	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
basal	17	363,34	38,79						
1				9	401,27	35,28	7	285,87	35,93
8				8	394,15	38,30	10	383,44	23,90

UKV (mEq/min/100g) EBA 1,5 g/kg									
tempo (dias)	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
basal	20	410,19	19,94						
1				11	386,00	24,16	13	351,1	16,84
8				10	388,55	30,21	12	401,5	26,94

UKV (mEq/min/100g) EBAT 1,0 g/kg									
tempo (dias)	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
basal	21	375,93	19,26						
1				12	492,53	28,76	11	473,75	39,80
8				11	473,46	21,99	12	462,79	25,05

Tabela 17- Carga excretada de sódio

UNaV (mEq/min/100g) EBA 0,5 g/kg									
tempo (dias)	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
basal	24	141,16	11,25						
1				14	145,79	17,54	12	137,18	24,60
8				11	134,35	20,08	10	141,34	23,96

UNaV (mEq/min/100g) EBA 1,0 g/kg									
tempo (dias)	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
basal	17	183,6	22,04						
1				9	168,85	35,21	7	94,53	21,12
8				8	209,85	32,45	10	182,78	22,61

UNaV (mEq/min/100g) EBA 1,5 g/kg									
tempo (dias)	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
basal	20	183,37	14,79						
1				11	176,73	29,28	13	220,36	17,93
8				10	232,67	22,33	12	250,10	26,84

UNaV (mEq/min/100g) EBAT 1,0 g/kg									
tempo (dias)	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
basal	21	189,12	13,24						
1				12	277,32	26,69	11	241,22	35,99
8				11	258,15	19,64	12	193,83	26,36

Tabela 18- Proteína excretada

UPrV (mg/min/100g) EBA 0,5 g/kg									
tempo (dias)	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
basal	24	4,48	0,35						
1				14	3,36	0,49	12	3,13	0,49
8				11	3,24	0,40	10	2,73	0,34

UPrV (mg/min/100g) EBA 1,0 g/kg									
tempo (dias)	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
basal	17	4,2	0,81						
1				9	2,99	0,59	7	2,18	0,55
8				8	2,78	0,41	10	1,79	0,37

UPrV (mg/min/100g) EBA 1,5 g/kg									
tempo (dias)	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
basal	20	4,09	0,34						
1				11	2,18	0,27	13	2,88	0,4
8				10	1,44	0,20	12	2,96	0,5

UPrV (mg/min/100g) EBAT 1,0 g/kg									
tempo (dias)	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
basal	21	3,22	0,39						
1				12	2,68	0,33	11	3,04	0,39
8				11	1,91	0,22	12	1,91	0,32

Tabela 19- Pressão arterial caudal

PAC (mmHg) EBA 0,5g/kg									
tempo (dias)	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
basal	24	134	2,6						
1				14	137	2,68	12	126	3,13
8				11	130	3,59	10	125	3,44

PAC (mmHg) EBA 1,0 g/kg									
tempo (dias)	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
basal	17	115	2,19						
1				9	110	3,66	7	94	2,65
8				8	115	2,16	10	94	4,29

PAC (mmHg) EBA 1,5 g/kg									
tempo (dias)	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
basal	20	136	2,75						
1				11	136	4,33	13	130	3,47
8				10	140	3,62	12	128	5,27

PAC (mmHg) EBAT 1,0 g/kg									
tempo (dias)	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
basal	21	134	2,88						
1				12	139	4,54	11	118	3,85
8				11	132	3,18	12	120	4,19

Tabela 20 - Variação diária do peso corporal

Variação diária do peso corporal EBA 0,5 g/kg/peso corporal									
tempo (dias)	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
25									
1		-4,70	1,79						
2		-6,70	1,33						
3		-4,88	1,27						
4		-2,78	1,25						
5				13	-11,85	7,60	13	-13,42	2,97
6					-16,00	2,21		-12,54	2,33
7					-15,46	1,57		-12,54	2,22
8					-13,81	1,36		-14,08	1,99
9					-15,00	2,02		-10,08	1,72
10					-21,15	1,26		-18,33	2,63
11					-21,11	1,50		-15,71	1,52
12					-20,39	1,85		-15,04	1,49
13					-15,77	1,77		-10,92	1,84
14					-13,19	2,29		-9,42	2,05

Variação diária do peso corporal EBA 1,0 g/kg/peso corporal									
tempo (dias)	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
20									
1		0,55	2,52						
2		2,03	2,24						
3		-1,38	3,09						
4		-2,4	3,36						
5				10	-12,10	5,58	10	-13,25	3,55
6					-8,65	3,80		-12,25	3,27
7					-12,80	3,89		-14,10	3,46
8					-5,70	2,86		-12,70	5,21
9					-6,30	4,75		-13,90	5,70
10					-17,15	6,72		-14,40	2,84
11					-11,20	6,10		-11,50	2,20
12					-9,05	5,64		-8,95	2,57
13					-6,75	5,67		-8,40	2,68
14					-4,70	5,14		-9,55	2,92

Tabela 20' - Variação diária do peso corporal

Variação diária do peso corporal EBA 1,5 g/kg/peso corporal									
tempo (dias)	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
25									
1		0,24	1,13						
2		0,04	1,27						
3		1,42	1,10						
4		0,74	1,34						
5				11	-8,50	2,13	14	-2,18	1,82
6					-9,32	1,84		-2,96	2,12
7					-8,59	1,79		-2,89	2,40
8					-4,96	2,10		1,32	2,67
9					-3,32	1,84		0,18	3,10
10					-7,09	2,43		-4,79	2,36
11					-7,00	2,06		-3,89	2,05
12					-5,32	2,00		-5,21	2,10
13					-2,23	2,80		-1,29	2,05
14					5,82	2,47		5,50	2,08

Variação diária do peso corporal EBAT 1,0 g/kg/peso corporal									
tempo (dias)	BASAL			CO			EBA		
	n	X	EPM	n	X	EPM	n	X	EPM
25									
1		-2,17	1,03						
2		-2,65	1,24						
3		1,35	1,10						
4		3,97	1,22						
5				13	-4,63	2,20	12	-2,00	1,34
6					-6,82	2,00		0,21	1,47
7					-7,55	2,26		0	1,51
8					-3,51	2,12		2,33	1,78
9					-1,51	2,50		2,96	2,36
10					-5,73	1,51		-0,92	2,51
11					-2,77	2,13		-1,33	2,19
12					-3,65	1,04		-3,79	1,36
13					-3,61	1,26		-2,08	1,88
14					8,11	2,07		6,92	2,03

Effect of crude extract of *Vernonia polyanthes* Less. on arteial blood pressure and renal sodium handling unanesthetized rats

Running title: Renal function and extract of *Vernonia polyanthes* Less.

Renata Romanezi da Silveira^a, Mary Ann Foglio²

and José Antonio Rocha Gontijo¹

¹Disciplina de Medicina Interna, Laboratório Balanço Hidro-Salino, Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Ciências Médicas, and ²Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agronômicas (CPQBA) Universidade Estadual de Campinas, 13083-100 Campinas, SP, Brasil

Correspondence:

J.A.R. Gontijo, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, 13083-100 Campinas, SP, Brasil.

FAX: 55-19-788 8861; E-mail: gontijo@nmce.unicamp.br

JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY

Abstract

The effect of crude *Vernonia polyanthes* Less. hydroalcoholic extract on arterial blood pressure and renal sodium handling was evaluated. Grinded powder of *Vernonia polyanthes* Less. dried leaves were submitted to reflux with 70% ethanol for two hours. The material was filtered and the solution reduced under vacuum resulting the crude hydroalcoholic extract (CHE) in 35% yield. We compared the arterial blood pressure and renal function in two animal groups (n=18 and n=10 each) of unanesthetized male Wistar-Hannover rats weighing approximately 300 to 400 g: 1) control, and 2) CHE-treated rats. Arterial blood pressure was measured weekly in conscious rats by tail-cuff method and renal function tests were performed in individual metabolic cages 0, 5 and 12 days after the beginning of CHE administration. CHE progressively decreased arterial blood pressure from $134 \pm 2,88$ mmHg to $118 \pm 3,85$ mmHg ($P < 0.05$) during the first week of treatment, also a significant rise in creatinine clearance from $348,57 \pm 15,84$ $\mu\text{l min}^{-1}$ 100 g body weight $^{-1}$ to $544,81 \pm 84,87$ $\mu\text{l min}^{-1}$ 100 g body weight $^{-1}$ ($P < 0.05$), a fall in fractional urinary sodium excretion from $0,23 \pm 0,02$ to $0,19 \pm 0,01$ % ($P < 0.05$) and sodium post-proximal fractional excretion from $18,09 \pm 1,25$ to $17,96 \pm 2,3$ % ($P < 0.05$), was observed when compared to the control group. These results were accompanied by a striking increase in fractional renal potassium excretion from $0,09 \pm 0,01$ % to $0,18 \pm 0,03$ % and from $0,09 \pm 0,01$ % to $0,16 \pm 0,02$ % during the first and second week of treatment when compared to the control group. A significant antinatriuretic differences occurred during the first week of treatment despite an increased sodium filtered load in the CHE group. These results suggested that CHE decreased significantly arterial blood pressure but attenuated the CHE-induced hypotension by promoting an additional decrease in tubule sodium excretion in post-proximal segments of nephrons. In conclusion, it was shown that *Vernonia* extract at a dose of 1,0 g/kg/day, is a potential vasodilatation agent in normotensive rats without any changes of renal autoregulation mechanisms.

Key words: *Vernonia polyanthes* Less.; plant extract; renal function; urinary sodium excretion and arterial blood pressure;

Introduction

The effect of *Vernonia polyanthes* Less. extract on arterial blood pressure and renal function is not completely known. In a diversity of plant extracts [flavonona obtained of *Citrus* sp. (Galati et al., 1996); *Lepidium latifolium* L. (Navarro et al., 1994); *Scrophularia frutescens* L. (Fernandez et al., 1994); *Bredemeyera floribunda* Wild. (Bevevino et al., 1994); *Cecropia obtusifolia* (Howell and Montero, 1996); *Alternanthera pungens* (Calderon et al., 1999); and others (Basualdo et al., 1991; Alliota-G et al., 1994)] have demonstrated diuretics and natriuretic activity. Likewise authors have implied this plant to have renal calcium and urate lithiasis dissolution activity and for treatment of urinary infection and urinary bladder dyscinesia (Van Den Berg, 1980; Alliota-G et al., 1994).

Despite the wide dissemination of *Vernonia polyanthes* Less., (Asteraceae), (Germtchújnicov, 1976; Silva et al., 1996) in Brazil and its use in folk medicine, the chemical and pharmacological properties have not been described (Silva et al., 1995).

Recently, a few medical properties of *Vernonia* extracts on urinary infection and urinary flow rate (Adeboye et al., 1997, Costa-Neto and Oliveira, 2000), gastrointestinal and respiratory symptoms (Campos and Caribé, 1991; Frutuoso et al., 1994; Costa-Neto and Oliveira, 2000), painless activity and miorelaxation effect (Frutuoso et al., 1994) have been suggested.

A slight but sustained diuretic and natriurectic effect was noted in anesthetized rats that received orally *V. polyanthes* Less. leave infusion (Silveira et al., 2000).

Renal lithium clearance (C_{Li}) has been increasingly used as a noninvasive method to estimate the output of sodium by the proximal renal tubules (Menegon et al., 1999, Xavier et al., 2000), thus permitting the study of various factors which could influence cation delivery from proximal tubule. The present study employed this clearance technique to evaluate changes of kidney sodium handling following chronic oral administration of *Vernonia polyanthes* Less extract in normotensive, unanesthetized and unrestrained rats. No studies mentioning the blood pressure and renal effect of *Vernonia* extracts have been published to the present day. The present data provide new information about the potential vascular and renal effect of this plant extract.

Materials and Methods

The experiments were performed on male Wistar-Hannover rats (300 to 400 g) allowed free access to water and normal rat chow. To examine the effect of oral administration of crude *Vernonia polyanthes* Less. extracts (CHE) on arterial blood pressure and renal sodium handling the rats were assigned to one of two groups (N = 18 and N = 10 each): 1) control (Co) and 2) animals chronically – treated with CHE (CHE-treated). The general guidelines established by the Declaration of Helsinki (1964) for laboratory animals were followed throughout the study.

Collection of plant material

Plant material was collected, out of flowering period, throughout the months of may until december at São Paulo State University (UNESP) in Botucatu, Brazil. A voucher specimeis as deposited in the herbarium of the Botany Department of Botany (UNESP), Botucatu.

Preparation of crude extract of *Vernonia* leaves.

The fresh leaves of *Vernonia polyanthes* Less. were dried under air circulation (40°C) and grinded in 9 UM - 40 mill. The powder (1Kg) was extracted with 70% ethanol under reflux for 1,5 h. After filtration the residue was re-extracted two more times with the same solvent. The three filtrates were united and redused under vacuum, resulting the CHE (350 g).

Dried extract was dissolved in distillated water and orally administered at daily doses of 1,0 g/kg body weight to male Wistar-Hannover rats during 14 consecutive days twice a day by gavage.

Experimental design

The experiments consisted of one control week followed by two weeks of oral administration of crude *V. polyanthes* Less. extract (corresponding to 1,0 g of dried leaves/kg/day) or water twice a day by gavage (in the same dose of the extract). Arterial blood pressure was estimated weekly in conscious, restrained rats by the tail-cuff method using an electrosphygmomanometer (Narco Bio-Systems, Austin, TX, USA). Once a week (control week (0), 5, 12 days after beginning CHE administration), the rats were weighed and housed in individual metabolic cages. Renal function tests were also performed.

Fourteen hours before the renal test, 60 mmol/LiCl/100 g of body weight was administrated by gavage. The rats were subsequently fasted with free access to tap water, housed individually in metabolic cages. The experiment was performed simultaneously for both control and treated group. At 8:00 a.m., each rat received a tap water load (5% of body weight) by gavage followed by a second load of the same volume 1 h later. Twenty minutes after the second load, spontaneously urine was collected at 30-min intervals over a 2-h period.

The urine passed through the funnel in the bottom of a cage into a graduated centrifuge tube. At the end of the experiment, blood samples were drawn by tail vein or by cardiac puncture.

Biochemical analysis.

Plasma and urine sodium, potassium and lithium concentrations were measured by flame photometry, whereas the creatinine was determined spectrophotometrically by the alkaline picrate.

Statistics and calculations.

The results are reported as means $\pm$ SEM per 100 g body weight. Renal clearance (C) was calculated by a standard formula ($C = UV/P$) using the plasma creatinine and lithium levels for each period. Creatinine clearance was used to estimate glomerular filtration rate and lithium clearance (CLi^+) was used to assess proximal tubule output. Fractional sodium ($FENa^+$) and potassium (FEK^+) excretions were calculated as CNa^+/CCr and CK^+/CCr , respectively, where CNa^+ and CK^+ are the ion clearances and CCr is the creatinine clearance. The fractional proximal ($FEPNa^+$) and post-proximal ($FEPPNa^+$) sodium excretions were calculated as $CLi^+/CCr \times 100$ and $CNa^+/CLi^+ \times 100$, respectively. Statistical analysis of the data was performed by one-way analysis of variance for repeated measurements. When the results were significant, ANOVA and t-test Student was used to determine the extent of the differences. A P value $< 0,05$ was considered to indicate significance.

Results

Figures 1 and 2 show the effects of crude *Vernonia polyanthes* Less. extract on renal function and arterial blood pressure. All rats survived and were clinically healthy up to the twenty-first day of the study. There were no significant differences between the daily solid rat chow intake (range: 23 to 20 g), liquid intake, serum sodium and lithium levels in control rats compared to the CHE group (Table 1).

The basal arterial blood pressure was not significantly different among the two groups. After 1 week, arterial blood pressure was significantly decreased in CHE-treated rats compared with the control group and reached $120 \pm 4,19$ mmHg by week 2 (second week post-treatment) compared to $134 \pm 2,88$ mmHg in control rats ($p < 0.05$) (Fig. 2). The arterial blood pressure did not change significantly in control group during the three weeks of the study (Figure 1).

The data from the renal function studies in the control and CHE-treated groups are shown in Figure 1 and 2. The urinary flow rates throughout the renal tubule sodium handling studies were not significantly different between the oral *Vernonia* extract administration and control groups. The glomerular filtration rate estimated by creatinine clearance (CCr), increase significantly compared to control from 30th min (CCr_{30-min} : from $348,57 \pm 15,84$ $\mu\text{L}/\text{min}/100$ g b.w. to $544,81 \pm 84,87$ $\mu\text{L}/\text{min}/100$ g b.w., CCr_{60-min} : from $292,08 \pm 28,98$ $\mu\text{L}/\text{min}/100$ g b.w. to $442,58 \pm 60,80$ $\mu\text{L}/\text{min}/100$ g b.w.) to 90th minute experimental intervals (CCr_{90-min} : from $269,39 \pm 13,99$ $\mu\text{L}/\text{min}/100$ g b.w. to $347,64 \pm 55,22$ $\mu\text{L}/\text{min}/100$ g b.w.), during the first week of CHE-treatment (Figure 2). Creatinine clearance rose transiently in CHE-treated rats by the 30th min interval (from $348,57 \pm 15,84$ $\mu\text{L}/\text{min}/100$ g b.w. to $426,92 \pm 31,28$ $\mu\text{L}/\text{min}/100$ g b.w.) after two weeks of CHE treatment. Creatinine clearance in the control rats did not change throughout the experiment. Crude *Vernonia* extract caused a sustained and significant decrease in fractional renal sodium (FENa⁺) excretion throughout the renal sodium handling studies by the 7th day after the CHE oral treatment (Figure 1). The decreased fractional urinary sodium excretion was accompanied by significant decrease by the 7th day post-treatment, in the post-proximal sodium excretion compared to control rats (Figure 1). This decrease occurred

despite significant rise in CCr (Fig. 2). However, the proximal sodium excretion did not change significantly in control or CHE-treated groups throughout the three weeks study (Figure 1).

These results were accompanied by a striking increase in fractional renal potassium excretion from $0,09 \pm 0,01$ % to $0,18 \pm 0,03$ % and from $0,09 \pm 0,01$ % to $0,16 \pm 0,02$ % in the first and second week of treatment when compared to control group.

Discussion and Conclusions

The salient findings of the present study suggested that the crude hydroalcoholic *Vernonia polyanthes* Less. extract (CHE) caused throughout two weeks of study a sustained decrease in arterial blood pressure and a striking rise in glomerular filtration rate estimated by creatinine clearance. Additionally, CHE treatment promoted a transient decrease in renal fractional sodium and increase in potassium excretion accompanied by a fall in the fractional post-proximal urinary sodium excretion despite unchanged proximal sodium handling and increased glomerular filtration rate and in the proportion of the sodium load filtered (Figure 1).

The dose of *Vernonia* extract used in the present study was similar to that employed in popular therapies for respiratory diseases and renal abnormalities (Campos and Caribé, 1991; Alliota-G et al., 1994). The present results demonstrated that chronic treatment of rats with a concentrated *Vernonia polyanthes* Less. hydroalcoholic extract did not interfere with animal food and water intake as well as body growth rate.

The crude *Vernonia* extract may influence tubular reabsorption by a direct effect on tubular sodium transport or by hemodynamically-mediated mechanisms involving a reduction in medullary blood flow. The nephron mechanism and the site of the renal sodium handling changes have not been identified. In the present study a decreased fractional sodium excretion followed by an enhanced fractional post-proximal sodium reabsorption between the seventh and fourteenth days after CHE administration were observed despite an increased filtered sodium load. Although neither RBF nor renal vascular resistance was measured in the present study, the GFR increased following

CHE-administration, suggesting an afferent arteriole vasodilatation. Taken together, these data support a role for tubular mechanisms in the conservation of sodium and water suggested an antinatriuretic response resulting from a compensatory natriuretic tubular action rather than from a modified glomerular filtration in response to decreased arterial blood pressure. That persistent fall in urinary sodium excretion produced by CHE administration may override the initial hypotensive effect. The precise mechanism underlying the arterial blood pressure falls induced by CHE-treatment has not been identified. The long-term control of arterial blood pressure is thought to be dominated by the renal control of fluid and electrolyte balance (Guyton et al., 1974; Guyton, 1999).

Our findings show that renal natriuretic responses possibly attenuated the CHE-induced decrease in arterial blood pressure (Figure 2) associated with an additional rise of post-proximal sodium reabsorption. Under our experimental conditions, the kaliuresis of CHE- treated animal can be explained as a consequence of a markedly increased distal sodium reabsorption and potential across luminal membrane (Wright and Giebisch, 1992).

However, we cannot rule out the participation of several neural and humoral factors contributing directly or indirectly to renal sodium retention after oral CHE administration.

Previous studies which examined the effects of *Vernonia* extracts on sodium excretion or arterial blood pressure response have yielded ambiguous results, perhaps because of differences in the experimental methods and animals, type of anesthesia, dose of extract and the *via* of *Vernonia* extract administration (Ribeiro et al., 1986; Silveira et al., 2000). Such factors could influence the extent to which renal perfusion pressure and renal vascular resistance responded to the CHE-treatment, thus affecting sodium excretion.

Qualitative phytochemical studies of *Vernonia polyanthes* Less. hydroalcoholic extract, *Vernonia cinerascens* and *Vernonia squamulosa* revealed the presence of hirsutinolides (lignans) and lactones (Bohlmann et al., 1983; Kotowicz et al., 1998; Abdel-Satar et al., 2000). It has been shown that a compounds from *Vernonia amygdalina* has smooth muscle cell relaxation activity in respiratory tract (Kasonia, 1995). This effect on smooth muscle cell could explain the hypotensive response observed after chronic *Vernonia* extract oral administration in our study.

While the present study provides fresh insights on renal sodium excretion in response to chronic oral *Vernonia* extracts administration, it should be borne in mind that the experiments examined whole kidney function in metabolic cages using unanesthetized, unrestrained rats.

In conclusion, the precise mechanism by which *Vernonia* extract affects sodium tubule transports and arterial blood pressure in the present experiments continues unknown. Further functional and phytochemical studies are required to establish the effect of unidentified *Vernonia* compounds on arterial blood pressure and renal function.

Acknowledgements

Research partially supported by CNPq (No.500868/91-3), FAPESP (95/1299-0) and CAPES.

References

- Abdel-Sattar, E., Mossa, J.S., el-Askary, H.I., 2000. Hirsutinolides from *Vernonia cinerascens*. *Pharmazie* 55 (2), 144-145.
- Adeboye, J.O., Asije, W., Awe, S.O., 1997. Diuretic and antidiuretic activity of the leaf extracts of *Vernonia cinerea* (Less) (Fam. Compositae). *Phytoterapy Research* 11 (6), 454-456.
- Alliota, G., Capasso, G., Pollio, A., Strumia, S., De-Santo, N.G., 1994. Joseph Jacob Plenck (1735-1807). *American Journal of Nephrology* 14 (4-6), 377-382.
- Basualdo, I., Zardine, E., Ortiz, M., 1991. Medicinal plants of Paraguay: Underground organs. *Economic Botany* 45 (1), 86-96.
- Bevevino, L.H., Vieira, F.S.A., Cassola, A.C., Sanioto, S.M.L., 1994. Effect of crude extract of *Bredemeyera floribunda* Willd: I. Effect on arterial blood pressure and renal excretion in the rat. *Journal of Ethnopharmacology* 43 (3), 197-201.
- Bohlmann, F., Zdero, C., King, R.M., Robinson, H., 1983. Hirsutinolides from *Vernonia polyanthes*. *Phytochemistry* 22 (12), 2863-2864.
- Calderón, C.P., Aseff, S.B.G., Fuentes, L.B., De Ruiz, R.L., Ruiz, S.O., 1999. Diuretic activity of *Alternanthera pungens* extracts in rats. *Bolletino Chimico Farmaceutico* 138 (2), 74.
- Campos, J.M., Caribé, J., 1991. Ervas medicinais. Plantas que ajudam o homem. São Paulo, Cultrix/Pensamento, p. 124, 261.
- Costa-Neto, E.M., Oliveira, M.V.M., 2000. The use of medicinal plants in the county of Tanquinho, state of Bahia, northeastern Brazil. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais* 2 (2), 1-8.
- Fernandez-Arche, M., Garcia-Gimenez, M.D., Saenz-Rodriguez, M.T., De La Puerta Vasquez, R., 1994. Effects of *Scrophularia frutescens* L. and *Scrophularia samucifolia* subsp. *Samucifolia* Maire on renal excretion. *Plantes Medicinales et Phytotherapie* 26 (4), 362-367.

- Frutuoso, V.S., Gurjão, M.R., Cordeiro, R.S., Martins, M.A., 1994. Analgesic and anti-ulcerogenic effects of a polar extract from leaves of *Vernonia condensata*. *Planta Médica* 60 (1), 21-25.
- Galati, E.M., Trovato, A., Kirjavainen, S., Forestieri, A.M., Rossitto, A., Monforte, M.T., 1996. Biological effects of hesperidin a *Citrus* flavonoid (III): antihypertensive and diuretic activity in rat. *Farmaco (Rome)* 51 (3), 219-221.
- Gemtchújnicov, I.R., 1976. Manual de taxonomia vegetal (plantas de interesse econômico, agrícolas, ornamentais e medicinais. São Paulo, ed. Agronômica Ceres, p.272-277.
- Guyton, A.C., Coleman, T.G., Cowley Jr., A.W., Manning Jr, R.D., Norman, R.A., Ferguson, J.D., 1974. A system analysis approach to understanding long-range arterial blood pressure control and hypertension. *Circulation Research* 35, 159-176.
- Guyton, A.C., 1990. Long-term arterial blood pressure control: an analysis from animal experiments and computer and graphic models. *American Journal of Physiology* 259, R865-R877.
- Howell, R.V., Montero, G.U., 1996. Actividade diuretica de la *Cecropia obtusifolia* (Moraceae) em ratas albinas. *Revista de Biologia Tropical* 44 (1), 93-96.
- Kasonia, K., 1995. Preliminary screening of plant extracts used in respiratory pathology in Kani/Zaire on isolated guinea pigs rings trachea. *Belgian Journal of Botany* 128 (2), 167-175.
- Kotowicz, C., Bardón, A., Catalán, C.A.N., Cerda-Garcia-Rojas, C.M., Joseph-Nathan, P., 1998. Glaucolides and hirsutinolides from *Vernonanthura squamulosa*. *Phytochemistry* 47(3), 425-428.
- Menegon, L.F., Figueiredo, J.F., Gontijo, J.A.R., 1999. Effect of chronic metabolic acidosis and renal growth and renal sodium handling in uninephrectomized rats. *Renal Failure* 21 (1), 13-22.
- Navarro, E., Alonso, J., Rodriguez, R., Trujillo, J., Boada, J., 1994. Diuretic action of an aqueous extract of *Lepidium latifolium* L. *Journal of Ethnopharmacology* 41 (1-2), 65-69.

- Ribeiro, R.A., Fiuza de Melo, M.M.R., Barros, F., Gomes, C., Trolin, G., 1986. Acute antihypertensive effect in conscious rats produced by some medicinal plants used in the State of São Paulo. *Journal of Ethnopharmacology* 15, 261-270.
- Silva, I., Franco, S.L., Conejero, C.I., 1995. Noções sobre o organismo humano e utilização de plantas medicinais. Assoeste, Cascavel, 203 p.
- Silva, I.M., Andrade, G.I., Fernandes, G.W., Lemos, J.P., 1996. Parasitic relationships between a gall-forming insect *Tomoglia rudolphi* (Diptera: Tephritidae) and its host plants (*Vernonia polyanthes*, Asteraceae). *Annals of Botany* 78 (1), 45-48.
- Silveira, R.R., Rúbio, C.R., Alves, M.J.Q.F., 2000. Modificações da diurese e da pressão arterial em ratos Wistar anestesiados, após administração oral de infuso de assa-peixe (*Vernonia polyanthes* Less.). *Revista Brasileira de Plantas Medicinais* 2 (2), 31-35.
- Van Den Berg, M.E., 1980. Contribuição à flora medicinal do Estado de Mato Grosso. *Ciência e Cultura* (supl. 33), 163-170.
- Wright, F.S., Giebisch, G. Regulation of potassium excretion. In: *The Kidney Physiology and Pathophysiology*. Raven Press Ltda, New York, 1992, p. 2209-2247.
- Xavier, F., Magalhães, A.M.F., Gontijo, J.A.R., 2000. Effect of inhibition of nitric oxide synthase on blood pressure and renal sodium handling in renal denervated rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 33 (3), 347-354.

Table 1: Effect of two weeks oral administration of *Vernonia polyanthes* Less. extract on body weight, food weight, liquid intake and serum sodium, potassium and lithium levels compared to oral water administration in unrestrained, unanesthetized rats. The data are reported as the mean, $\pm$ SEM, for 10 rats per group. (t Student test).

	Body weight (g)	Food weight (g)	Liquid intake (ml)	Na ⁺ (mM)	K ⁺ (mM)	Li ⁺ (μ M)
Co	324 $\pm$ 3,6	23 $\pm$ 1,0	44 $\pm$ 3,5	136 $\pm$ 1,2	3,7 $\pm$ 0,1	0,19 $\pm$ 0,01
CHE	330 $\pm$ 4,4	20 $\pm$ 0,8	41 $\pm$ 1,3	136 $\pm$ 1,5	5,2 $\pm$ 0,3*	0,19 $\pm$ 0,01

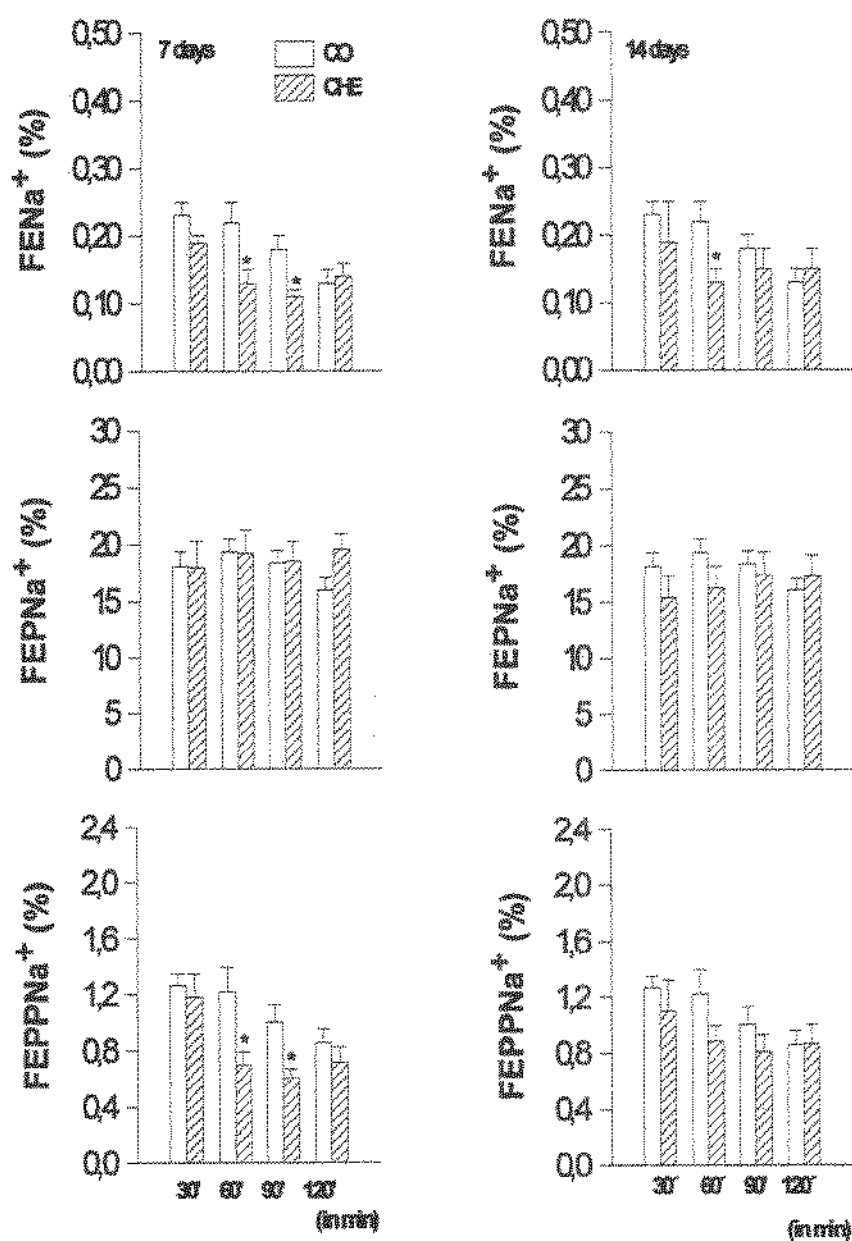


Figure 1: Extract of oral CHE administration on fractional sodium (FENa⁺), fractional proximal (FEPNa⁺) and post-proximal (FEPPNa⁺) tubule sodium excretion in control rats (Co) and CHE treatment. The data are reported as the mean, $\pm$ SEM, *P<0,05 (t-Student test).

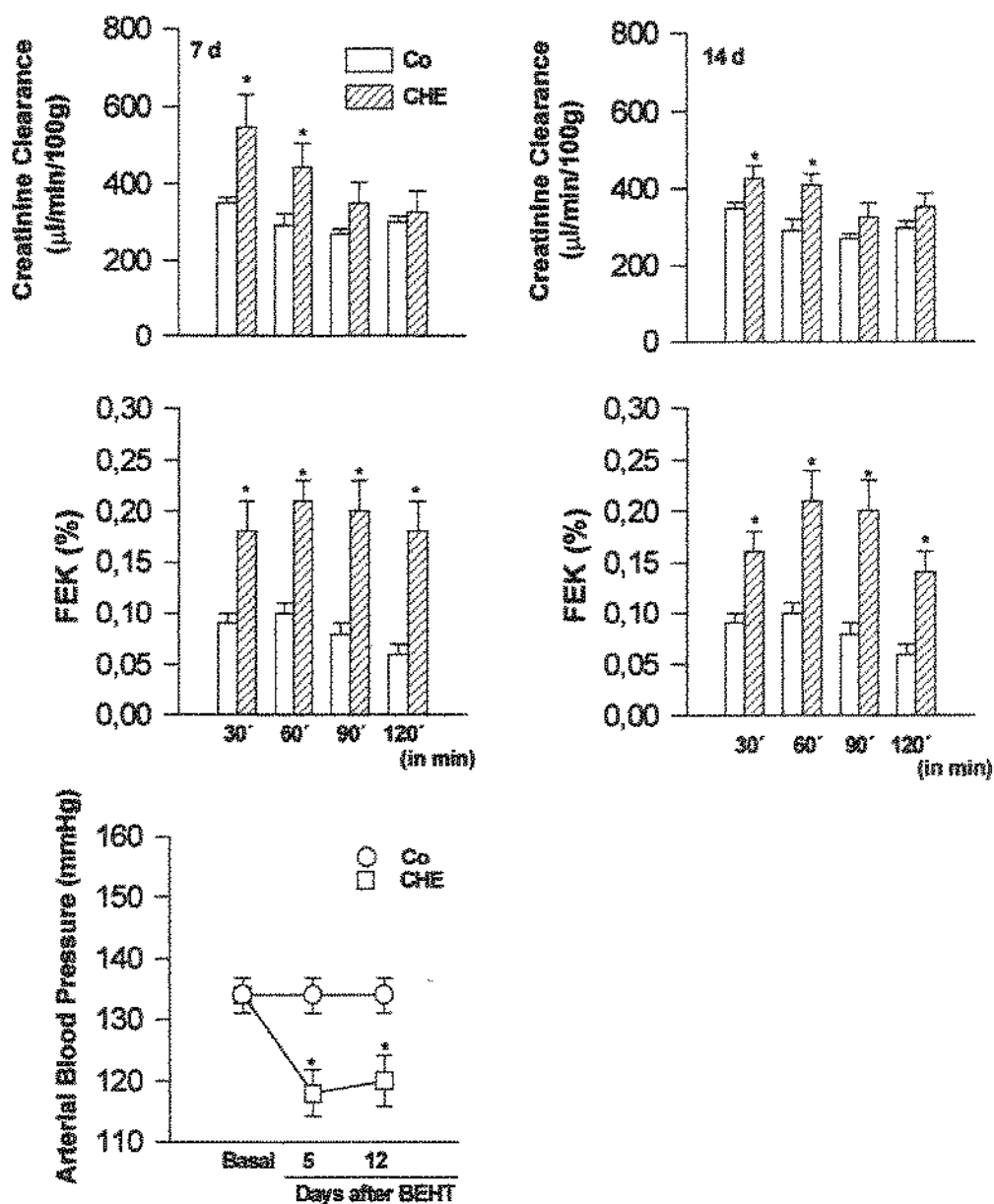


Figure 2: Effect of oral CHE administration on creatinine clearance, fractional potassium excretion (FEK) and arterial blood pressure in control rats (Co) and CHE treatment. The data are reported as the mean, $\pm$ SEM, * $P < 0,05$ (t-Student test).