

# 1. INTRODUÇÃO

O ácido úrico (AU) produzido principalmente no fígado é o produto final do metabolismo das purinas, adenina e guanina. O aumento da sua concentração no sangue, acima dos valores de referência (homens = 3,4 a 7,0 mg/dL e mulheres = 2,4 a 6,0 mg/dL), leva a hiperuricemia (HU) [1], o que corresponde a uma prevalência de 5 a 8% da população masculina nos Estados Unidos, atuando como o principal fator de risco para o desenvolvimento da gota [2], sendo que nessa nos países ocidentais, afeta cerca de 1-2% dos adultos, com uma prevalência aumentada com a idade, sendo 7% em homens com mais de 65 anos e 3% em mulheres acima de 85 anos [3], sendo associada também à disfunção renal, doença cardiovascular, hipertensão, diabetes [4] e síndrome metabólica (SM) [5].

O AU é um ácido fraco e a sua forma ionizada, o urato pode ser encontrado no plasma humano, na sinóvia e no líquido extracelular [6]. A HU e gota podem surgir na presença ou ausência de distúrbios clínicos subjacentes ou exposições tóxicas a drogas. Quando o processo o qual resultou a HU não é identificado é denominada primária ou idiopática, quando identificado, ela é classificada como secundária. No entanto tanto a HU primária como secundária na maioria das pessoas afetadas são resultados da diminuição da excreção de AU renal e não da sua superprodução [2]. Já a gota é uma doença inflamatória causada pelos depósitos de cristais de urato monossódico (CUM) no líquido ou tecido sinovial, sendo que a formação desses cristais se devem a consequência da HU [7].

Os medicamentos atualmente mais utilizados na prática clínica para a HU, são os inibidores da xantina oxidase (XO) e os agentes uricosúricos (probenecide e benzobromarona). O alopurinol, inibidor da XO, é amplamente prescrito para o tratamento da HU e gota, mas a síndrome de hipersensibilidade ao alopurinol continua a ser um perigo grave e potencialmente letal, que pode se desenvolver dentro dos três primeiros meses de introdução. Efeitos tóxicos graves induzidos pelo alopurinol atingem <1% dos pacientes, mas pode ser fatal, com uma taxa de mortalidade de cerca de 20% [7,8] e as drogas uricosúricas estão associadas a um risco elevado de urolitíase [9]. O probenecide é geralmente ineficaz em doentes com insuficiência renal concomitante e a benzobromarona é eficaz em pacientes com insuficiência renal moderada, mas possui um risco de hepatotoxicidade grave [10].

Há alguns anos, muitos inibidores da XO tem sido isolados e caracterizados a partir de plantas medicinais, sendo alternativas viáveis no tratamento da HU [11].

34           A *Echinodorus macrophyllus* (Kunt) Micheli (Família Alismataceae), popularmente  
35 conhecida como "Chapéu-de-Couro", é uma planta medicinal que cresce abundantemente  
36 no Brasil, sendo utilizadas na medicina popular como adstringente, diurética, antiarrítmica,  
37 na artrite reumatóide, aterosclerose, infecções de pele, doenças respiratórias, hepáticas, do  
38 trato urinário (litíase e nefrolitíase) [12,13] e diminuição do ácido úrico sérico (AUs) [14],  
39 mas com comprovação científica apenas na atividade imunossupressora [15] anti-  
40 inflamatória [16] e nefroprotetora [17].

41           Nesse sentido, buscamos investigar e validar o efeito da *Echinodorus macrophyllus*  
42 (*E. macrophyllus*) como antimicrobiana frente a diferentes cepas, confirmar  
43 cientificamente o seu uso empírico na HU, estabelecer a  $D_{L50}$  bem como analisar o seu  
44 potencial genotóxico e mutagênico identificando e medindo a atividade de seus compostos  
45 que possam causar danos ao DNA, uma vez que agentes químicos ambientais são  
46 importantes fatores tanto em termos de desenvolvimento como de prevenção do câncer  
47 [18], contribuindo assim para a utilização da espécie na medicina tradicional de forma  
48 segura.

49

## 50 2. REVISÃO DA LITERATURA

51

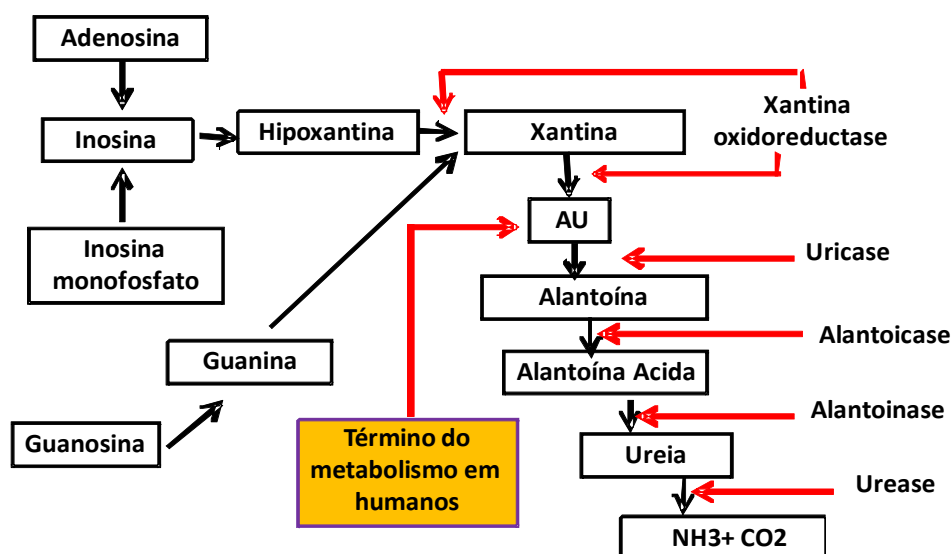
### 52 2.1 Etiologia

53

54 O AU é produzido no fígado e em menor quantidade no intestino delgado [19], é  
55 um metabólito das purinas, adenina e guanina, sendo eliminado pelos rins e trato gastroin-  
56 testinal. O AU é filtrado pelo glomérulo e reabsorvido integralmente no túbulo proximal,  
57 sendo as secreções tubulares e a reabsorção pós-tubular determinante na concentração final  
58 do AU na urina [1].

59 A maioria dos mamíferos têm baixos níveis de AUs, pois ele é convertido pela  
60 enzima uricase em alantoína, um produto altamente solúvel, sendo livremente eliminado  
61 pela urina. A alantoína na maioria dos peixes e anfíbios é degradada através do ácido  
62 alantóico por alantoicase e alantoinase a uréia e glioxilato. Em alguns marinhos  
63 invertebrados e crustáceos, a uréia é convertida em amônia ( $\text{NH}_3$ ) e dióxido de carbono  
64 ( $\text{CO}_2$ ) pela urease (figura 1) [20].

65 Diferentes de outros mamíferos, nos seres humanos o AU é o produto final do me-  
66 tabolismo das purinas, fato atribuído à perda da atividade da enzima uricase, devido ao  
67 aparecimento de diversas mutações no gene humano durante o processo evolutivo sendo a  
68 principal razão pela qual os níveis de AUs em adultos ficam em torno de 6,0 mg/dL, em  
69 comparação com a maioria dos mamíferos que têm níveis de AUs entre 0,5-1,0 mg/dL  
70 [21]. Os humanos estão também susceptíveis as alterações na concentração de AU  
71 induzidas pela dieta, sendo uma das razões para a desenvolvimento espontâneo da HU e  
72 gota [22].



73

74

75 **Figura 1:** Diagrama do metabolismo das purinas76 **FONTE:** Hayashi e Fujiwara [20]

77

78 A HU reflete um distúrbio metabólico dos líquidos extracelulares, sendo definida  
 79 como concentrações séricas de urato superior a 7,0 mg/dL em homens e 6,0 mg/dL em  
 80 mulheres na pré-menopausa, enquanto nas mulheres pós-menopausa, o comportamento é  
 81 semelhante aos homens [22], isso é devido a diminuição nos níveis de estrogênio, o qual é  
 82 uricosúrico, entretanto, no tratamento hormonal (estrogênico) na menopausa as  
 83 concentrações de AUs tendem a ficar em valores abaixo dos níveis normais [23].

84

## 85 2.2 Hiperuricemia

86

87 A concentração plasmática de AU é mantida em um nível relativamente constante  
 88 nos seres humanos, graças ao equilíbrio entre produção e excreção. O AU deriva de fontes  
 89 exógenas e endógenas, resultando na quebra das purinas a partir dos ácidos nucleicos du-  
 90 rante a renovação celular [24].

91 A HU é devida a produção excessiva de AU, excreção insuficiente ou uma combi-  
 92 nação das duas [1], sendo que em indivíduos hiperuricêmicos 90% se devem a excreção  
 93 renal prejudicada, enquanto apenas cerca de 10% é devido a sua superprodução [25].

94 A Hiperuricosúria é tipicamente definida como excreção urinária aumentada de AU  
 95 (níveis > 1.000 mg/24 h) [26] e vários fatores genéticos e ambientais podem aumentar a

96 excreção devido a sua maior produção, sendo conseqüentemente a hiperuricosúria proposta  
97 como mecanismos de formação de litíase por AU na gota primária [27, 28].

98 O AU, quando em níveis altos e sob determinadas condições, precipita como CUM.  
99 A deposição destes cristais na sinóvia ou no líquido sinovial leva ao desenvolvimento da  
100 gota [24]. E parece existir uma relação dose dependente, com incidência cumulativa de  
101 gota em 05 anos, de acordo com os níveis de AU, sendo 10,8 %, 27,7 % e 61,1 % para  
102 concentrações de 7-7,9 mg/dL, 8-8,9 mg/dL e acima de 9 mg/dL, respectivamente [29]. A  
103 superprodução de AU, decorrente da síntese aumentada de purina, é observada em cerca de  
104 10 a 20 % dos pacientes com gota primária. Além disso, foram identificados quatro defei-  
105 tos hereditários específicos de síntese de purinas: super atividade da fosforribosilpirofosfa-  
106 to sintetase; deficiência de glicose 6 fosfatase; deficiência de frutose 1 fosfato aldolase e  
107 deficiência de hipoxantinaguanina fosforribosiltransferase (HGPRT) [30].

108 Destes defeitos hereditários, o mais bem conhecido é a deficiência de HGPRT. A  
109 deficiência total desta enzima está associada ao desenvolvimento da síndrome de Lesch  
110 Nyhan em crianças, a qual consiste em uma síndrome hereditária, causada por uma muta-  
111 ção no gene HGPRT1 localizado no braço longo do cromossomo X. É um erro inato do  
112 metabolismo das purinas no qual a alteração de comportamento é a manifestação mais  
113 marcante, enquanto a deficiência parcial foi associada ao aparecimento precoce de gota e  
114 nefrolitíase [24, 30].

115 A HU pode ser secundária a numerosas condições, como na insuficiência renal, o-  
116 besidade, consumo de álcool e uso de drogas. Os pacientes com gota secundária relaciona-  
117 dos à doença renal são hiperuricêmicos devida à diminuição da carga filtrada de AU [31],  
118 caso ligado também a HU associada à terapia diurética, a qual resulta da depleção de vo-  
119 lume, bem como na reabsorção tubular intensificada [32].

120 Outro caso de HU está associado ao uso de fármacos, onde podemos citar a aspiri-  
121 na, a qual mesmo em doses baixas pode causar alterações significativas na excreção renal  
122 do urato dentro de um período de uma semana após o início da terapia, particularmente em  
123 pacientes idosos [33].

124 A maioria das doenças causadoras de HU secundária caracterizadas pela superpro-  
125 dução de AU está associada à renovação aumentada de ácido nucléico. Estas doenças in-  
126 cluem o mieloma múltiplo, policitemia, anemia perniciosa, hemoglobinopatias, talassemia,  
127 outras anemias hemolíticas, outros distúrbios mielo e linfoproliferativos, além de outras  
128 neoplasias [24].

129 A precipitação de AU e inflamação induzida por cristais já ocorrem em concentra-  
130 ções de 6,5 a 7 mg/dL, sendo que, o urato precipita sob a forma de CUM. As condições  
131 locais teciduais responsáveis pela precipitação e deposição dos cristais são a temperatura  
132 mais baixa (como aquela encontrada nas articulações periféricas), níveis de pH mais baixos  
133 no líquido extracelular e a diminuição da ligação do urato às proteínas plasmáticas. Outros  
134 fatores locais que contribuem para a precipitação e deposição dos cristais são o traumatismo  
135 e a elevação rápida da concentração de urato local, como resultado da mobilização de  
136 água a partir dos tecidos periféricos (como ocorre quando os pés edemaciados ficam eleva-  
137 dos durante o sono) [24].

138

### 139 **2.3 Gota**

140

141 A gota é uma desordem provocada pela precipitação, nos espaços articulares, de  
142 CUM provenientes dos fluidos corporais supersaturados de uratos, sendo que a gota primária  
143 é responsável por cerca de 90 % dos casos e 10 % secundária. A gota primária designa  
144 os casos nos quais as causas básicas são incertas como nos defeitos enzimáticos desconhe-  
145 cidos ou ocasionados por um defeito metabólico congênito como a super produção de AU  
146 com a sua excreção normal, já na gota secundária a causa da HU é conhecida, mas a gota  
147 não necessariamente é a desordem clínica principal, estando relacionada com outras doen-  
148 ças, por exemplo, em leucemias, doença renal crônica (DRC) ou no uso de tiazidas (fárma-  
149 cos diuréticos), onde ocorre a diminuição na excreção de AU. Mas independente da causa,  
150 níveis elevados de AUs e outros fluidos corpóreos levam a precipitação de CUM [1, 24].

151 De acordo com Marc & Lloyd [34], as manifestações morfológicas da gota são ar-  
152 trite aguda, artrite tofácea crônica, tofos e nefropatia gotosa:

153 • Artrite aguda é caracterizada por um infiltrado neutrofílico denso que se espalha  
154 pelo fluido sinovial (líquido transparente e viscoso das cavidades articulares e bainhas dos  
155 tendões), e são frequentemente encontrados CUM longos, finos, em forma de agulha, no  
156 citoplasma dos neutrófilos. O sinóvio se encontra congesto e contém células inflamatórias  
157 mononucleares dispersas.

158 • Artrite tofácea crônica evolui da precipitação repetitiva de CUM durante os ata-  
159 ques agudos, onde o urato cobre pesadamente a superfície articular e forma depósitos visí-  
160 veis no líquido sinovial, o que o torna hiperplásico, fibrótico e espessado por células infla-  
161 matórias, formando um pannus que destrói a cartilagem subjacente, levando a erosões ós-

162 seas justarticulares. Nos casos graves, pode surgir anquilose fibrosa ou óssea, resultando  
163 em perda da função da articulação.

164 • Os tofos são formados por grandes agregados de CUM circundados por uma in-  
165 tensa reação inflamatória de linfócitos, macrófagos e células gigantes tipo corpo estranho,  
166 na tentativa de fagocitar as massas de cristais. Os tofos podem aparecer na cartilagem arti-  
167 cular das articulações e nos ligamentos, tendões e tecidos moles periarticulares, incluindo  
168 lobos da orelha, cartilagens nasais, e pele das pontas dos dedos. Os tofos superficiais po-  
169 dem levar a grandes ulcerações da pele subjacente, mas qualquer articulação pode ser  
170 acometida com a inflamação inicial da gota aguda ou crônica, a qual também pode estar  
171 envolvida na causa de fratura patológica ou reabsorção em casos de implante de ossos.

172 • A nefropatia gotosa se refere a diferentes complicações renais múltiplas associa-  
173 das à deposição de urato, formando tofos medulares, precipitações intratubulares, ou cris-  
174 tais de AU livre e cálculo renal. Complicações secundárias como pielonefrite podem ocor-  
175 rer principalmente quando existe obstrução urinária.

176 A gota deve ser interpretada criticamente, de forma integrada com a avaliação clí-  
177 nica, pois para cada caso de gota, existem nove de HU assintomática [35]. Além disso, as  
178 doenças crônicas podem estar associadas à gota e à HU, seja na forma primária ou na for-  
179 ma secundária. As associações mais bem conhecidas são a doença renal e a hipertensão,  
180 que frequentemente ocorrem em pacientes com gota [36]. Os cálculos renais formam-se  
181 em 10 a 40 % dos pacientes com gota [37]. A maioria dos cálculos encontrados em pacien-  
182 tes com gota é constituída por AU. Entretanto, alguns são compostos de oxalato de cálcio e  
183 outros constituintes, e a HU parece contribuir também para a formação destes cálculos  
184 [38].

185 A HU e a gota há muito tempo são associadas à obesidade, ao diabetes, à hiperlipi-  
186 demia e à doença cardiovascular aterosclerótica. Nos distúrbios lipídicos, a gota está prin-  
187 cipalmente associada à hipertrigliceridemia, que, por sua vez, pode estar associada ao con-  
188 sumo de bebidas alcoólicas ou a um efeito de certos subtipos de lipoproteínas sobre a ex-  
189 creção de AU [39-41].

190 Dados recentes apontam que a litíase renal de AU faz parte de um espectro de a-  
191 normalidades associadas à obesidade e resistência à insulina no caso do diabetes tipo 2  
192 [41].

193 O hipotireoidismo é mais prevalente entre pacientes com gota, o qual foi demons-  
194 trado que os níveis de urato diminuem com a instituição da terapia de reposição tireóidea,

195 provavelmente via mecanismo renal [42]. Pacientes com níveis de AUs de 6 mg/dL  
196 tiveram um risco aumentado de crises de gota sendo importante o acompanhamento regular  
197 do AUs, a fim de adequar o tratamento da gota [43].

198 Tem sido demonstrado a associação entre AUs e os níveis de componentes  
199 individuais da SM o qual apresenta ser mais forte em adultos do que em crianças, sendo  
200 evidenciado, também, a associação de AU com o Índice de Massa Corporal (IMC), o que  
201 leva a concluir que o elevado níveis de AUs desempenha um papel chave na patogênese da  
202 SM e sua influência começa na infância [44].

203

## 204 **2.4 Epidemiologia**

205

206 A prevalência da HU na população mundial tem aumentado de forma constante ao  
207 longo dos últimos 40 anos [24], o que corresponde a uma prevalência de 5 a 8% da popula-  
208 ção masculina nos Estados Unidos [2], um estudo mostrando um banco de grande atenção  
209 gerenciada nos EUA indica que a prevalência da gota e/ou HU aumentou de 2,9/1000  
210 pessoas em 1990 para 5,2/1000 pessoas em 1999, particularmente naqueles com idade > 65  
211 anos, especialmente os homens com idade > 75 anos, a prevalência praticamente dobrou  
212 [45], fato em parte atribuível ao aumento dos fatores de risco para a gota incluindo a SM,  
213 hipertensão e doença renal que estão associadas com a idade [46].

214 Segundo o Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS),  
215 no ano de 2013 no Brasil foram notificados 09 casos de óbitos em decorrência de  
216 distúrbios do metabolismo das purinas e 41 em relação a gota, está última sendo 39 do  
217 sexo masculino e 2 no feminino. Já a ocorrência de óbitos por insuficiência renal no Brasil  
218 foi de 13.058 casos, sendo que 2.762 em São Paulo, seguido de Minas Gerais com 1599,  
219 Rio de Janeiro com 1.578 e 151 casos no Mato Grosso do Sul, para o mesmo período [47].

220 Em relação a internações hospitalares em todo o Brasil no ano de 2014 a artrite  
221 reumatóide e outras poliartropatias inflamatórias tiveram 17.603 casos notificados, sendo  
222 que as deformidades adquiridas das articulações somaram 7.166 casos. Em relação às do-  
223 enças renais associadas à HU e gota como as síndromes nefríticas agudas, glomerulares,  
224 renais túbulointersticiais, insuficiência renal e urolitíase somaram no Brasil 277.293 inter-  
225 nações no ano de 2014, onde a insuficiência renal fez 98.154 casos e a urolitíase 71.955  
226 [48].



227 A HU está aumentando em todo o mundo, possivelmente devido às mudanças nos  
228 hábitos alimentares [49], visto que, vários alimentos afetam positivamente ou  
229 negativamente os níveis de AUs. Neste caso, os produtos lácteos, café e vitamina C  
230 diminuem os níveis, enquanto que a carne vermelha, mariscos, frutose (bebidas  
231 açucaradas) e álcool promovem o aumento [50, 51].

232 Estudos indicam que a HU crônica é um fator de risco independente para  
233 hipertensão, SM, DRC e doenças cardiovasculares [52], sendo prevalentes em adultos [53],  
234 mas também acometendo crianças [54].

235 Em estudo realizado por Singh *et al* [55], foi evidenciado que a morbidade e morta-  
236 lidade perinatal foi aumentada em mulheres com nível de AU aumentado. Já em um estudo  
237 realizado com 200 idosos hospitalizados, sendo 81 homens (idade média de  $67,6 \pm 6,3$  a-  
238 nos) e 119 mulheres (idade média  $68,5 \pm 8,4$  anos), foram avaliadas as correlações do AU  
239 com diversas doenças e observou que a prevalência de HU foi de 21% nos homens e  
240 15,1% em mulheres, apontando significativa associação entre HU e idade, e ainda foi ob-  
241 servada relação entre a HU com os valores aumentados de: pressão arterial, IMC, triglice-  
242 rídeos, glicose em jejum e creatinina sérica não apresentando relação entre o aumento do  
243 AUs e o colesterol HDL [56].

244

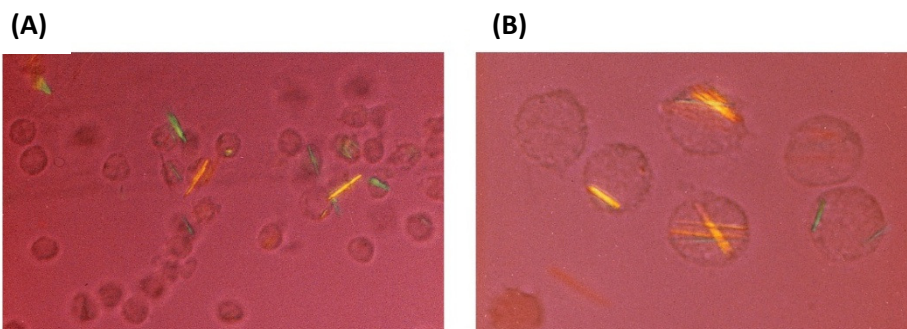
## 245 **2.5 Diagnóstico da Hiperuricemia e Gota**

246

247 O diagnóstico da HU é caracterizada quando o AUs encontra-se acima dos valores  
248 de referência (7,0 mg/dL em homens e 6,0 mg/dL em mulheres), mostrando o ponto de  
249 saturação de urato e sua solubilidade à temperatura e pH fisiológicos [57].

250 A HU é a característica bioquímica típica da gota, entretanto a gota só pode ser di-  
251 agnosticada pela demonstração dos CUM de birrefringência negativa no líquido sinovial  
252 examinado por microscopia de luz polarizada, sejam livres ou dentro de leucócitos poli-  
253 morfonucleares [24], demonstrado na figura 2.

254



**Figura 2:** Observação de cristais de urato monossódico (CUM) livres (A) ou dentro de leucócitos polimorfonucleares (B)

**FONTE:** Edward [24]

De acordo com Chachá & Louzada [58], o diagnóstico para a gota deve ser suspei-  
tado na população sob risco, levando-se em conta idade, sexo, clínica, comorbidades, hábi-  
tos e uso de drogas. Pode ainda ser definitivo ou provável.

1) **Definitivo:** A detecção de CUM com birrefringência negativa e formato de agu-  
lha no líquido sinovial, examinado ao microscópio de luz polarizada, constitui um achado  
de diagnóstico definitivo da gota. Quase todo o líquido sinovial aspirado no início de um  
ataque agudo contém cristais em forma de agulha típicos com birrefringência negativa,  
podendo ser extracelular ou ocorrer junto aos leucócitos polimorfonucleares. A contagem  
de leucócitos na maioria dos líquidos sinoviais gotosos atinge uma faixa de 10.000 a  
60.000/mm<sup>3</sup>, embora possa chegar a níveis significativamente mais altos em alguns pacien-  
tes.

2) **Provável:** Combinação das três condições abaixo:

- a. História de monoartrite episódica, intercalada com períodos totalmente as-  
sintomáticos;
- b. Resolução rápida com o uso de colchicina (48h);
- c. Hiperuricemia

## 2.6 Tratamentos da Hiperuricemia e Gota

A terapia, na gota, é dirigida, primariamente, à crise aguda e, secundariamente, à  
correção da HU, causa básica das crises [59].

## 2.6.1 Tratamento da crise aguda de Gota

A crise aguda de gota consiste em uma reação inflamatória induzida por depósitos de CUM em articulações de indivíduos com HU. Para reduzir a intensidade e duração da dor e da perda de função, tem sido preconizados colchicina, anti-inflamatórios esteróides e não esteróides (AINE), sendo a colchicina oral e/ou AINE os de primeira escolha para essa fase. Em pacientes intolerantes ou resistentes onde ocorre a falha terapêutica a esses dois medicamentos, os glicocorticóides podem ser uma boa opção, tanto via oral como intra-articulares [60], entretanto o tratamento prolongado (acima de 30 dias) apresenta efeitos adversos comprometendo a eficácia nas doenças crônicas [22].

### 2.6.1.1 Colchicina

A colchicina é um alcalóide derivado de uma planta a *Colchicum autumnale*, ela é capaz de reduzir a atividade dos neutrófilos, a fagocitose e transporte de CUM e reduzir as moléculas de adesão sobre as células endoteliais em resposta a IL-1 (interleucina-1) ou TNF (fator de necrose tumoral) [60, 61]. Em um ensaio clínico, a colchicina foi comparada a placebo em pacientes com crise de gota, mostrando 34% de redução da dor e 30% de redução de sinais inflamatórios articulares, sendo que os participantes em uso do fármaco apresentaram diarreia e vômitos. A colchicina vem sendo abandonada pela alta incidência de efeitos adversos, em detrimento dos AINEs, pois são bem mais tolerados e tem efeitos terapêuticos mais previsíveis que a colchicina [62].

### 2.6.1.2 Anti-inflamatórios não esteróides ( AINEs)

Os AINEs possuem propriedades analgésica, antitérmica, anti-inflamatória e anti-trombótica. Sua ação anti-inflamatória decorre da inibição da síntese de prostaglandinas, efetuada mediante inativação das ciclo-oxigenases constitutiva (COX-1) e induzível (COX-2). São medicamentos para tratamentos sintomáticos, não interferindo com a história natural das doenças inflamatórias [63].

Entre os AINEs temos a indometacina, a qual tem sido tradicionalmente considerada como um agente particularmente eficaz, embora ainda necessitem de mais ensaios. As principais limitações dos AINEs convencionais são os efeitos colaterais

316 conhecidos como problemas gastrointestinais, cardiovasculares e renais, e a possibilidade  
317 de interações com outras drogas tomadas pelo paciente em ataques artríticos ou que  
318 apresentem comorbidades [60].

319 Em pacientes com doenças renais, hepáticas e cardíacas seu uso deve ser cauteloso  
320 e em pacientes idosos ou com alguma outra condição de risco que precisa receber cronicamente  
321 um AINE, este deve ser associado ao uso de medicamentos antissecretores gástricos,  
322 pois pode predispor a sangramentos gastrointestinais [63].

323 Os inibidores das ciclo-oxigenase 2 (COX-2) são uma opção em pacientes com  
324 problemas gastrointestinais ou intolerância aos AINEs [60].

325

### 326 **2.6.1.3 Glicocorticóides**

327

328 Para um curto período de tempo (5 a 10 dias) os glicocorticóides foram considera-  
329 dos eficazes. Dentre os efeitos adversos sistêmicos da corticoterapia crônica com anti-  
330 inflamatórios esteróides estão a indução à diabetes, osteoporose, miopatia proximal, pre-  
331 disposição a infecções, doença péptica, manifestações psiquiátricas, alterações oculares,  
332 ganho de peso, síndrome de Cushing, sintomas de deficiência adrenal (na retirada\ rápida  
333 após uso prolongado) e contraposição a tratamento anti-hipertensivo [64].

334

### 335 **2.6.2 Tratamento da Hiperuricemia**

336

337 Devido a HU ser um pré-requisito para o desenvolvimento da gota, o objetivo pri-  
338 mário da terapia de redução do AUs é manter as concentrações de urato abaixo do ponto de  
339 saturação para CUM. EULAR e ACR guidelines recomendam que os níveis de AUs sejam  
340 mantidos em concentrações < 6 mg/dL. Entretanto o alvo é manter os níveis séricos < 5  
341 mg/dL na presença de gota tofácea severa [64,65]. Os resultados de níveis baixos de AUs  
342 acarretariam em uma redução mais rápida do tamanho dos tofos e presume-se que isto  
343 também aconteça com os cristais depositados nas articulações [66].

344 Existem três grupos de fármacos utilizados para reduzir os níveis de AUs, são os  
345 inibidores da XO, drogas uricosúricas e agentes uricase [60].

346

347

348

### 2.6.2.1 Inibidores da XO

349

350

351 Os inibidores da XO bloqueiam a síntese de AU. O alopurinol tem sido utilizado na  
352 prática clínica há quase 50 anos, é a droga de primeira escolha para o controle a longo  
353 prazo da HU e gota. Devido à sua eficiência, baixo preço e perfil de risco bem conhecido, é  
354 um fármaco amplamente prescrito [67]. Ele interfere nos passos terminais da biossíntese  
355 do AU, por inibição da XO, é usado de maneira especial quando há disfunção renal ou cál-  
356 culos de urato e quando agentes uricosúricos não podem ser empregados sendo contra in-  
357 dicado em HU assintomática. O tratamento é continuado interruptamente, mesmo se ocor-  
358 rer precipitação e nova crise de gota, não havendo necessidade da sua suspensão [68].

359 O alopurinol é um análogo da hipoxantina e inibe a enzima XO, é eficaz em reduzir  
360 os níveis de AUs, o que o coloca como base no tratamento da HU e gota, mas é necessário  
361 reduzir a dose em pacientes com insuficiência renal ou terapia diurética devido o aumento  
362 do risco de efeitos tóxicos, já em pacientes com função renal saudável, as doses diárias são  
363 de 300-600 mg por dia [69].

364 Os pacientes com uso de alopurinol podem desenvolver a síndrome de  
365 hipersensibilidade, sendo grave e potencialmente letal, que pode ocorrer nos três primeiros  
366 meses de introdução do alopurinol. Os seus efeitos tóxicos graves surgem em < 1 % dos  
367 pacientes, mas pode ser fatal, com uma taxa de mortalidade de cerca de 20 % [7,8]. Além  
368 de manifestações gastrointestinais (náuseas, vômitos, diarreia) [19].

369 Para casos moderados da hipersensibilidade ao alopurinol, a dessensibilização pode  
370 ser uma opção, mas é muito perigoso nos casos mais graves. Uma associação de reação de  
371 hipersensibilidade grave com o antígeno leucocitário humano (HLA) tem sido observado  
372 em pacientes Chineses e Coreanos, então o teste HLA deve ser considerada nesta  
373 população antes de iniciar o tratamento com alopurinol [64].

374 O acúmulo de oxipurinol, principal metabólito do alopurinol é considerado crucial  
375 para o desenvolvimento das reações de hipersensibilidade, assim, os doentes com história  
376 de erupções cutâneas graves induzidas pelo alopurinol, requerem interrupção permanente  
377 do medicamento. Os resultados de estudos têm mostrado, que para 30-60% dos pacientes,  
378 ainda são prescritos alopurinol um ano depois do início da terapia e que o tratamento da  
379 gota é frequentemente inadequado [19].

380 Febuxostate é um novo inibidor seletivo da XO aprovado nos Estados Unidos e  
381 União Européia [70], ele foi aprovado na Europa em 2009, para o tratamento de doenças

382 crônicas e HU, em condições de existência de deposição de urato (incluindo uma história,  
383 ou presença de tofo e/ou artrite gotosa), sendo mais eficaz do que o alopurinol no subgrupo  
384 com comprometimento da função renal, não necessitando de ajuste da dose na  
385 insuficiência renal de leve a moderada [71]. Os efeitos colaterais do febuxostato incluem  
386 distúrbios gastrointestinais (náuseas, dispepsias, diarreia, constipação), dores de cabeça,  
387 elevada atividade das enzimas hepáticas [70] e um pequeno aumento na taxa de eventos  
388 cardiovasculares graves, o que impede a utilização em doentes com isquemia cardíaca  
389 congestiva [19].

390

### 391 **2.6.2.2 Agentes Uricosúricos**

392

393 A maioria dos pacientes com gota tem a excreção de AU prejudicada, e os agentes  
394 uricosúricos podem ser utilizados como terapia de segunda linha, principalmente quando o  
395 alopurinol não é tolerado [66]. As drogas uricosúricas estão associadas com um risco  
396 elevado de urolitíase, além disso, a ingestão de líquidos deve ser aumentada e o pH da  
397 urina mantido acima de 6,0 para impedir o desenvolvimento de cálculos de AU [9].

398 A benzobromarona continua disponível em alguns países europeus (excessão dos  
399 Estados Unidos). É principalmente indicada no respectivo tratamento de doentes  
400 resistentes ou intolerantes ao alopurinol [72], podendo ser utilizada em doentes com  
401 insuficiência renal moderada, [73], seu uso foi limitado após relatos de hepatotoxicidade  
402 [74].

403 O probenecide é preferido como primeira escolha entre os fármacos uricosúricos  
404 disponíveis nos Estados Unidos [64], mas vale ressaltar que os medicamentos uricosúricos  
405 devem ser utilizados com cautela, a urina deve ser alcalinizada e aumentar a ingestão de  
406 líquidos, mas tendo outra opção racional disponível. Para os casos de difícil uso do  
407 alopurinol, para diminuir a quantidade total de urato formado, uma droga uricosurica é de  
408 extrema importância, uma vez que ocorre o aumento da depuração renal de uratos  
409 diminuindo os níveis de AUs [60].

410

### 411 **2.6.2.3 Agentes Uricases**

412

413 A rasburicase é uma enzima recombinante que converte o AU em alantoína, meta-  
414 bólito que é 5 a 10 vezes mais hidrossolúvel que o AU. Deste modo, 4 horas após a admi-

415 nistração de rasburicase verifica-se uma diminuição significativa dos níveis de AUs. Nos  
416 doentes com insuficiência renal não oligúrica ele é mais eficaz que o alopurinol na corre-  
417 ção da HU e recuperação da função renal [75]. Ela foi aprovada na Europa pela Food and  
418 Drug Administration (FDA) em 2002 como uma enzima urato oxidase recombinante para  
419 níveis de AUs elevado, ela difere do alopurinol, uma vez que pode afetar o AU no plasma  
420 existente e o alopurinol influencia apenas a futura produção de AU pela inibição da XO. A  
421 rasburicase também é utilizada para a síndrome de lise tumoral induzida por quimioterápi-  
422 cos, porém com possíveis reações de hipersensibilidade graves [76].

423 Em 2010, a FDA aprovou pegloticase (Krystexxa) um recombinante suíno da urica-  
424 se que, administrado por via intravenosa, rapidamente reduz os níveis séricos de urato,  
425 sendo utilizada para minimizar a imunogenicidade, mas ainda assim tem um elevado po-  
426 tencial de reações adversas incluindo anafilaxia [74].

427

### 428 **2.6.3 Outras Drogas**

429

430 Outras drogas têm demonstrado induzir uma ligeira à moderada diminuição do AU,  
431 com base nas suas propriedades de indução da farmacodinâmica renal funcionando como  
432 uricosúricos, dentre elas estão o losartan e fenofibrato, que não são rotulados para a terapia  
433 da HU ou como para a prevenção primária da gota, mas podem ser considerados como  
434 terapias coadjuvantes nesses pacientes artríticos em uso do alopurinol, ou hiperlipidemia e  
435 hipertensão concomitante [77]. A Vitamina C em doses consideradas como um suplemento  
436 dietético também mostra ser um leve agente uricosúrico [78].

437

### 438 **2.6.4 Profilaxia de novas crises de Gota**

439

440 A diminuição dos níveis de urato frequentemente induz a mobilização dos cristais,  
441 resultando em ocorrência das crises agudas quando altas doses de medicamentos são  
442 administrados [79]. Já na fase intercrítica (entre as crises agudas da gota) associada a droga  
443 hipouricemiante (alopurinol), o tratamento utilizado para evitar novas crises, tem sido a  
444 colchicina na forma de profilaxia. A administração diária de 0,5-1,5 mg de colchicina  
445 evita, na maioria dos casos, tais crises. A profilaxia é recomendada durante os primeiros 6  
446 meses [80].

447 Entretanto, os pacientes com intolerância a colchicina, a alternativa utilizada são  
448 doses pequenas de AINE, como naproxeno ou indometacina [60].

449 Alguns pacientes com gota mal solucionada, ainda tem crises de gota, mesmo com  
450 drogas redutoras de AU e com profilaxia com dose apropriada de colchicina. Para estes  
451 pacientes vale a pena dar, além de um aumento progressivo do tratamento com alopurinol,  
452 uma profilaxia mais completa, incluindo colchicina e uma pequena dose de um AINE.  
453 Ocasionalmente, os doentes necessitam da adição de prednisona junto a colchicina durante  
454 1-3 meses para permitir um tratamento sem complicações para reduzir os níveis de AUs.  
455 Para pacientes com profilaxia especialmente difícil, IL-1 ou de bloqueio pode ser uma  
456 alternativa a considerar. A longo prazo, a melhor profilaxia é implementar o tratamento  
457 para a redução dos níveis de AUs para uma adequada dissolução dos cristais de CUM,  
458 para que as crises de gota não ocorram [2].

459 Não se definiu eficácia em medidas não medicamentosas, como a redução de peso,  
460 diminuição na ingestão de álcool e uso de produtos dietéticos na prevenção de novos ata-  
461 ques da gota [74].

462

### 463 **2.6.5 Perspectivas**

464

465 As pesquisas com plantas medicinais podem favorecer a descoberta de medicamen-  
466 tos fitoterápicos, atribuir novos usos aos já utilizados e padronizados, bem como propiciar  
467 a purificação e isolamento de novas moléculas bioativas. De acordo com Filho e Yunes  
468 [81] a base das pesquisas de metabólitos bioativos de plantas consiste no fato de que toda  
469 substância, independente de sua proporção na planta, e de ser conhecida ou não, pode ser  
470 um princípio ativo. Somando a esses fatos sabemos que produtos naturais, principalmente  
471 de origem vegetal, têm sido muito utilizados na medicina tradicional para o tratamento da  
472 HU e gota, sendo de suma importância a sua pesquisa tanto farmacológica quanto toxico-  
473 lógica [82].

474

### 475 **2.7 Plantas Medicinais**

476

477 O programa de medicina tradicional da Organização Mundial da Saúde (OMS) res-  
478 salta a importância dos estudos das plantas usadas na medicina popular com o objetivo de  
479 verificar tanto seu possível efeito terapêutico, como também a possível presença de subs-



480 tâncias tóxicas. Estes fatos enfatizam a necessidade de metodologias científicas para carac-  
481 terizar os efeitos fisiológicos, farmacológicos e toxicológicos das plantas medicinais e so-  
482 mando a esses fatos a necessidade de isolamento e purificação dos eventuais compostos  
483 que apresentam atividade biológica [83].

484 É reconhecida a importância da fitoterapia, sugerindo ser uma alternativa viável e  
485 importante também às populações dos países em desenvolvimento, já que seu custo é  
486 diminuído e cerca de 80% da população usa a medicina tradicional nos cuidados primários  
487 de saúde [84].

488 O Brasil apresenta-se com a maior diversidade genética do mundo, com estimativa  
489 de 55 mil espécies catalogadas, entretanto nas duas últimas décadas tem crescido  
490 anualmente apenas 8% as informações sobre o uso de plantas medicinais [85].

491 O uso de plantas para fins terapêuticos tem sido utilizadas no estado do Mato  
492 Grosso do Sul, principalmente na região do Pantanal e região fronteiriças. Várias tribos  
493 indígenas tem ajudado na disseminação destes conhecimentos desde a Guerra do Paraguai  
494 (1864-1870), com isso, as atividades extrativistas foram intensificados em outras  
495 comunidades e agora fazem parte da vida do sul matogrossense, quer para fins medicinais  
496 ou apenas para trazer conforto em face de suas adversidades diárias [86].

497 Os compostos ativos como os flavonóides, taninos e polifenóis presentes nos  
498 produtos vegetais tem sido relatados por sua atividade na inibição da XO, sendo utilizados  
499 para a HU e gota [87], nos dando indícios que os agentes hipouricêmicos podem ser  
500 derivados a partir dos produtos naturais [88].

501 Os flavonóides são amplamente encontrados em plantas e contribui com o sabor e  
502 cor de muitas frutas e legumes. São conhecidos por possuírem ações biológicas e  
503 farmacológicas, incluindo as atividades antibacterianas, antivirais e atividades  
504 antimutagênicas, além disso tem mostrado poder antioxidante, como inibição dos sistemas  
505 enzimáticos responsáveis pela geração de radicais livres, além de aumentarem a eliminação  
506 do AU em nível renal [87].

507 Os flavonóides presentes nos extratos das folhas da *Pistacia integerrima*  
508 apresentaram atividade antioxidante e inibidora da XO e a sua fração de acetato de etila  
509 demonstrou efeito na redução dos níveis séricos de AU em modelo animal induzido pela  
510 frutose [89].

511 A teobromina, uma dimetilxantina natural presente em quantidades elevadas no ca-  
512 cau, atua como um inibidor de nucleação e o crescimento de cristais de AU, o que pode  
513 torná-la clinicamente útil no tratamento da litíase por AU [90].

514 Extrato etanólico de *Lychnophora trichocarpa*, espécie conhecida como arnica  
515 usada na medicina popular Brasileira para tratamento de doenças inflamatórias, encontrada  
516 apenas no cerrado brasileiro, mostrou que alguns dos seus compostos ativos podem ser  
517 agentes para o tratamento da artrite gotosa, uma vez que possui ambas as propriedades  
518 anti-hiperuricêmica e anti-inflamatória. O extrato etanólico bruto e sua fração de acetato de  
519 etila mostraram efeitos significativos na redução do AU e foi capaz de inibir significativa-  
520 mente a atividade da XO no fígado *in vivo*, a uma dose de 250 mg/kg [91].

521 Antioxidantes, anti-inflamatórias e atividade inibidora da XO dos flavonóides faz  
522 das plantas medicinais candidatas ideais para o tratamento da HU e da artrite gotosa [91].

523 Na Coreia do Sul, Japão e países europeus um cogumelo denominado *Pleurotus os-*  
524 *treatus*, demonstrou efeito inibidor da XO, tendo efeitos contra a gota em doses de 500 e  
525 1000 mg/kg em modelo de rato Sprague-Dawley induzidos por ácido oxônico (AO) [92].

526 Já Chen *et al*, avaliaram o efeito da *Smilax china* sobre animais hiperuricêmicos  
527 induzidos com frutose a 10% e concluiu que a fração de acetato de etila apresentou  
528 atividade anti-hiperuricêmica e nefroprotetora com o aumento da fração de excreção de  
529 uratos (FEUA) [93].

530 Estudo feito com o extrato bruto de *Hibiscus sabdariffa* L. (Malvaceae), um dos  
531 mais tradicionais chás Chinês, consumidos em todo o mundo como uma bebida fria ou  
532 quente, que contém polifenóis, flavonóides, e antocianinas, foi observado que o tratamento  
533 com o mesmo inibiu a HU em ratos induzida por AO, com um maior efeito na diminuição  
534 do AU do que o tratamento com alopurinol [94].

535

### 536 **2.7.1 *Echinodorus macrophyllus***

537

538 *Echinodorus macrophyllus* (Kunth) Micheli da família Alismataceae, popularmente  
539 conhecido como "Chapéu de couro", "Cha-mineiro", "erva-de-pântano", "erva-de-bugre",  
540 "Congonha-do-campo" e "erva-do-brejo", é encontrado em áreas do Brasil, particularmente  
541 alagadas e de solo úmido (figura 3) [95], sendo listada na Farmacopéia Brasileira em 1926  
542 e 1959 [96].



543  
544 **Figura 3:** Espécie *Echinodorus macrophyllus* em seu habitat natural

545 **FONTE:** Vaz, (2015)

546  
547 A família Alismataceae é constituída por espécies arbóreas adaptadas a locais úmi-  
548 dos e semissombreados, com aproximadamente 14 gêneros e 80 espécies [97].

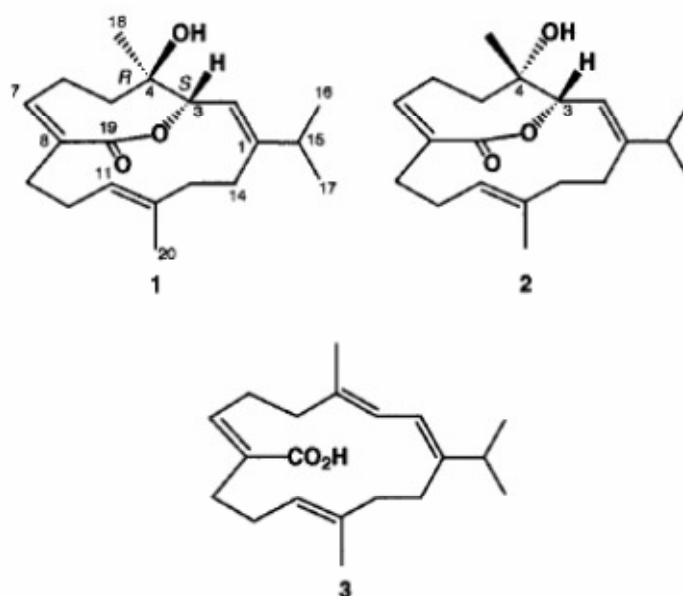
549 No Brasil existem dois gêneros da família Alismataceae de ocorrência espontânea:  
550 *Echinodorus* e *Sagittaria*, sendo que o gênero *Echinodorus* é formado por 18 espécies, e a  
551 *Sagittaria* 06 [95,98]. O gênero *Echinodorus* possui duas espécies que são utilizadas na  
552 medicina popular: *grandiflorus* (diurético, doenças de pele, disfunções renais e hepáticas,  
553 reumatismo, artrite, amigdalite, faringite, estomatite e gengivite) e *macrophyllus* (diurético,  
554 depurativo, anti-inflamatório, reumatismo, diminuição do AU e disfunções renais) [99].

555 A *E.macrophyllus* é nativa do Brasil, constitui-se de uma planta perene, robusta,  
556 sempre com folhas emersas, caracterizadas principalmente por suas folhas grandes ovais  
557 lanceoladas, pecíolo cilíndrico, limbo geralmente oval, inflorescência em panícula, com 3-  
558 15 flores que apresentam pedicelo cilíndrico, ereto ou recurvado e numerosos carpelos.  
559 Fruto do tipo aquênio, ligeiramente alado com glândulas lineares [100], pode atingir 1,20  
560 m de comprimento e 60 cm de largura, sendo esta espécie distribuída desde a América  
561 Central até o Sul do Brasil [101].

562 A *E.macrophyllus* fez parte do projeto “Produção, processamento e comercializa-  
563 ção de ervas medicinais, condimentares e aromáticas” desenvolvido pela Empresa Brasilei-

564 ra de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) de Campinas/SP e cultivada em diversas unidades  
 565 como Corumbá/MS, Dourados/MS, Petrolina/PE e Canoinhas/SC [102]. Além disso, o  
 566 extrato da *E. macrophyllus*, é um dos principais ingredientes utilizado na fabricação de uma  
 567 bebida refrescante consumida no Brasil, chamada de “Mineirinho®”, industrializado pela  
 568 empresa “Refrigerantes Flexa Ltda.”, com ampla área de cultivo em Tanguá-RJ, e de outro  
 569 refrigerante chamado “Mate Couro®”, produzido em Belo Horizonte-MG [100].

570 No extrato metanólico das folhas da *E. macrophyllus* foram encontradas principal-  
 571 mente flavonóides, triterpenos e taninos [101], sendo ainda detectada a presença de diter-  
 572 penos equinolidos A e B (figura 4), derivados do tipo cembrano com uma lactona diterpê-  
 573 nica com 08 membros, ela ainda é uma planta pouco estudada do ponto de vista fitoquími-  
 574 co [103].



575  
 576 **Figura 4:** Equinolido A (1), equinolido B (2) e ácido equinólico (3).

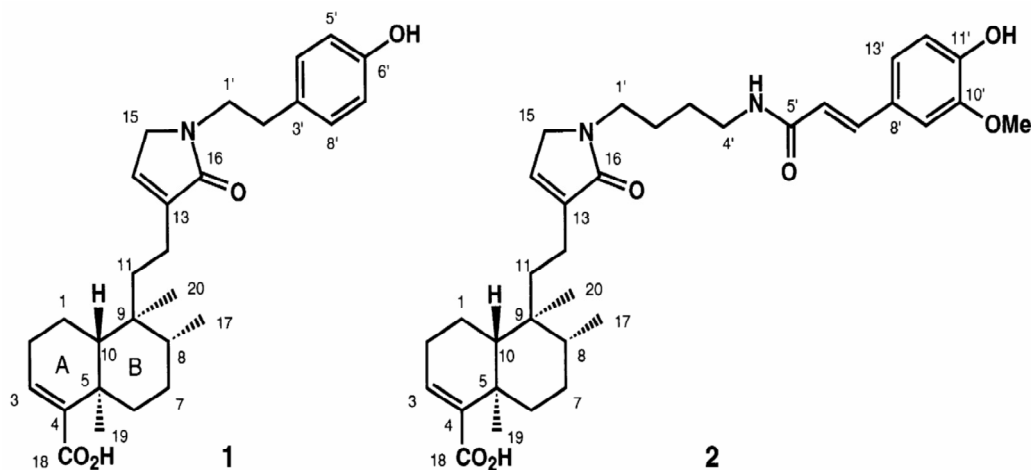
577 **FONTE:** Shigemori *et al* [103]

578

579 De acordo com Bruneton [104] uma grande variedade de lactonas apresenta  
 580 atividade antibacteriana, a maioria contra bactérias Gram positivas. Kobayashi *et al* [105]  
 581 fracionaram o extrato metanólico das folhas de *E. macrophyllus*, levando a novos derivados  
 582 diterpenóides com esqueleto clerodano contendo nitrogênio e um único anel lactâmico,  
 583 como as echinofilinas (figura 5).

584

585



**Figura 5:** Echinofilina A (4); Echinofilina B (5), derivados diterpenóides do tipo clerodano.

**FONTE:** Kobayashi *et al* [105]

Além dessas substâncias nos extratos das folhas de *E. macrophyllum* foram isoladas e identificadas outras classes de substâncias químicas como alcalóides, glicosídeos, óleos essenciais, saponinas, polifenóis, esteróides e ácidos orgânicos [105]. Os flavonóides desempenham um papel crucial na atividade hipouricemiante, indicando que eles são capazes de reduzir o AU, sendo na eliminação do AU em nível ranal ou inibindo a XO [106]. Portanto, extratos de *E. macrophyllum* podem ser ótimos candidatos no tratamento da HU.

Não existem muitos estudos farmacológicos sobre a *E. macrophyllum*, entretanto, algumas de suas atividades podem ser justificadas pela presença dos mesmos compostos químicos em outras espécies de plantas.

Alguns compostos encontrados nas folhas da *E. macrophyllum* como exemplo, os flavonóides, possuem ação diurética, antimicrobiana, antiedematosa, anti-inflamatória e anti-hepatotóxica [101].

Outros compostos, como as saponinas, possuem um efeito laxante suave e também atividade diurética. Os taninos têm a propriedade de precipitar proteínas, formando uma camada protetora sobre a pele e as mucosas, agindo em diversas infecções, prevenindo a penetração de agentes que podem ser nocivo em mucosas danificadas, isso podem facilitar a cicatrização, por exemplo, em queimaduras. Também podem contribuir em casos de hemorragias, promovendo a contração dos vasos capilares [101].

As folhas da *E. macrophyllum* são utilizadas sob a forma decocção, infusão, ou engarrafado e é um reputado remédio na medicina popular brasileira sendo utilizadas como

612 adstringentes, diurética, antiarrítmica, para o tratamento artrite reumatóide, aterosclerose,  
613 infecções de pele, doenças do fígado, trato urinário ( litíase e nefrolitíase), respiratória  
614 [12,13] e diminuição do ácido úrico sérico (AUs) [14].

615 Em estudo realizado na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul em duas é-  
616 pocas distintas (1992 e 2002) em relação às plantas medicinais mais solicitadas aos raizei-  
617 ros do centro da cidade, ou por eles indicados, revelou que 27 espécies foram citadas em  
618 1992 e 32 em 2002, e a *E.macrophyllus* ficou entre as seis espécies mais frequentemente  
619 consumidas pela população [107].

620 No estudo de Rangel *et al* [16], aonde avaliaram os efeitos da folha de extrato  
621 etanólico da *E.macrophyllus* em modelos experimentais agudos e subcrônicos de  
622 inflamação em ratos, os resultados demonstraram inibição significativa e potente do edema  
623 de pata e da migração de leucócitos na cavidade pleural, ambas induzidas pela carregenina,  
624 além do que, promoveu o aumento da permeabilidade vascular induzida por ácido acético  
625 intraperitoneal e reduziu o edema de orelha induzida por agente irritante.

626 De acordo com o estudos realizados por Portela *et al* [17], e Nascimento *et al* [108]  
627 demonstram comprovações científicas de que a *E.macrophyllus* possui atividade  
628 nefroprotetora e renoprotetora respectivamente, indicando que ela pode ter aplicações  
629 terapêuticas em disfunções renais, mas estudos adicionais são necessários para confirmar  
630 os resultados e avaliar a aplicabilidade do modelo na HU.

631 Pinto *et al* [15] também relataram que as partes aéreas da *E.macrophyllus* possui  
632 efeito imunossupressor na resposta humoral exacerbada ou respostas imunes celulares,  
633 assim como em doenças reumática autoimunes. Considerando a artrite reumatóide uma  
634 doença autoimune caracterizada por uma inflamação no líquido sinovial das articulações e  
635 que a resposta humoral e celular podem contribuir para esta inflamação [109] , este efeito  
636 imunossupressor sugere que o extrato aquoso da *E.macrophyllus* possa ser utilizado nesta  
637 patologia.

638 A descoberta e divulgação da flora medicinal e suas propriedades, através do  
639 conhecimento popular e suas respectivas comprovações científicas, é uma ferramenta  
640 importante para a preservação da cultura e riqueza das diferentes regiões, além de  
641 promover tratamento [110].

642

643

644

## 2.8 Estudos Antimicrobianos

645

646

647 A resistência antibiótica é considerada um grande problema de saúde com relatos  
648 de crescente resistência em isolados clínicos [111]. Recentemente a aceitação da medicina  
649 tradicional como uma forma alternativa de tratamentos reafirmaram a necessidade de  
650 investigar a atividade antimicrobiana de plantas medicinais [112].

651

652 Em geral, bactérias têm habilidade genética de transmitir e adquirir resistência a  
653 drogas usadas como agentes terapêuticos e são frequentes os relatos sobre isolamentos de  
654 bactérias que eram reconhecidamente sensíveis às drogas de uso na rotina, mas que se  
655 tornaram resistentes a todos ou a quase todos os fármacos disponíveis no mercado [113].

655

656 Existem sérias preocupações quanto à eficácia futura dos antibióticos atualmente  
657 disponíveis e a falta de novos antibióticos no mercado, levando à necessidade de novas  
658 pesquisas com foco em investigação, regulamento e economia [114], já que o número de  
659 novos agentes antimicrobianos lançados para o uso terapêutico vem diminuindo a cada  
660 ano, entre os anos de 1983 a 1987 foram lançados 16 antimicrobianos, entre os anos 2003 a  
661 2007 foram lançados apenas 4 novos agentes antimicrobianos [114,115].

661

662 Em um estudo realizado por Baba *et al* [116] para avaliar a ação antioxidante e  
663 antibacteriana das folhas e raízes de *Gentiana kurroo*, verificou que ela apresentava as  
664 duas ações sendo associado positivamente com o teor fenólico e teor de flavonóides dos  
665 extratos. Com isso, a presença de flavonóide também, na *E.macrophyllus* pode indicar a  
666 possibilidade da mesma apresentar tais funções.

666

667 Nos testes *in vitro* a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração  
668 Mínima Bactericida (CMB) são os parâmetros mais comumente avaliados para avaliar a  
669 atividade antimicrobiana. A CIM representa a menor concentração de um antimicrobiano  
670 que inibe o crescimento de um micro-organismo em testes de sensibilidade, esse  
671 crescimento deve ser visível. A CMB representa a concentração mínima capaz de reduzir  
672 99,9% do inóculo bacteriano inicial [116,117].

672

673 Muitas pesquisas vêm sendo realizadas com o objetivo de serem encontradas novas  
674 moléculas derivadas de plantas com propriedades biológicas. Em um estudo verificando o  
675 extrato hidroalcoólico da *E.macrophyllus* obteve resultado positivo contra *Klebsiella*  
676 *pneumoniae*, *Salmonella typhimurium* e *Staphylococcus aureus* e em outros testando outras  
677 linhagens de bactérias o extrato encontrou atividade moderada frente a *Streptococcus*

677 *pyogenes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Echerichia coli*  
678 inibindo parcialmente o crescimento microbiano [118, 119].

679 Diante de tais informações e da necessidade de descoberta de novos fármacos que  
680 possam suprir as emergências em saúde selecionamos alguns micro-organismos para que  
681 novas pesquisas com agentes antimicrobianos e a ampliação das pesquisas com os já  
682 utilizados na clínica sejam realizadas.

683 Além disso, é necessário identificar as substâncias antioxidantes e antimicrobianas  
684 presentes em plantas, investigar seu potencial benefício para a saúde e avaliar as  
685 implicações do seu uso pela população [119].

686

## 687 **2.8.1 Micro-organismos**

688

### 689 **2.8.1.1 *Staphylococcus aureus***

690

691 O *Staphylococcus aureus* é um coco Gram positivo que reside sobre a pele,  
692 mucosas e trato respiratório superior e é incapaz de invadir a pele ou as membranas  
693 intactas. Porém, a infecção geralmente se inicia com a inoculação traumática do micro-  
694 organismo. É um patógeno virulento que secreta enzimas e toxinas que lesam as  
695 membranas, são capazes de destruir eritrócitos, leucócitos, plaquetas, fibroblastos e outras  
696 células [120].

697 Secreta mexotoxinas e enzimas causadoras de infecções de pele como impetigo, fu-  
698 rúnculos, abscessos subcutâneos e infecções sistêmicas como síndrome do choque tóxico e  
699 síndrome do choque tóxico neonatal, sendo um patógeno frequente em infecções hospita-  
700 res em todo o mundo [121].

701

### 702 **2.8.1.2 *Escherichia coli***

703

704 Compreende um grupo de cepas de bactérias Gram negativas aeróbias que habitam  
705 o trato intestinal de humanos e animais. A espécie apresenta diversos sorotipos, ou seja,  
706 variações antigênicas. Cada sorotipo é capaz de causar diferentes infecções entéricas, uri-  
707 nárias e bacteremias hospitalares, utilizando diferentes combinações de fatores de virulên-  
708 cia [122].

709



### 710 **2.8.1.3 *Pseudomonas aeruginosa***

711

712 É um bacilo aeróbio Gram negativo oportunista presente em infecções hospitalares,  
713 urinárias e sepse, estando mais suscetíveis a pacientes com queimaduras. Possui alta morta-  
714 lidade podendo chegar a 33% em pacientes imunodeprimidos [123].

715 Atualmente, se posiciona entre as principais bactérias causadoras de infecções hos-  
716 pitalares graves, com elevada letalidade. Outra característica marcante e preocupante desta  
717 espécie é a resistência cruzada aos antimicrobianos, que resulta da corresponsabilidade, ou seja,  
718 da presença de múltiplos mecanismos de resistência num único hospedeiro levando à resis-  
719 tência a múltiplos fármacos [123].

720

### 721 **2.8.1.4 *Salmonella***

722

723 O gênero *Salmonella* compreende mais de 1500 tipos de bacilos Gram negativos  
724 antigenicamente distintos, porém genética e bioquimicamente relacionados, causadores de  
725 enterocolites, adquiridas após a ingestão de alimentos contaminados, elas são capazes de  
726 produzir fatores de virulência como as enterotoxinas e citotoxinas, causadoras de danos  
727 celulares e consequente disseminação da bactéria na mucosa intestinal [124].

728 A salmonelose é um problema comum de saúde pública, apesar das melhorias nas  
729 condições sanitárias e de processamento dos alimentos. As formas clínicas podem se apre-  
730 sentar como diarreia aquosa e/ou inflamatória, algumas vezes bacteremia, febre entérica e  
731 outras infecções extras intestinais [125].

732

### 733 **2.8.1.5 *Candida albicans***

734

735 O gênero *Candida* representados por leveduras atuam como patógenos oportunistas  
736 desencadeando doenças em indivíduos com fatores adversos, essencialmente os imuno-  
737 comprometidos e por compor a microbiota, fazendo parte das mucosas digestivas e genital  
738 dos seres humanos e muitos mamíferos, ela é a espécie mais comumente envolvida [126].  
739 No hospedeiro, a proteção contra infecções fúngicas ocorre em primeiro momento pelas  
740 barreiras físicas, como pele, mucosas, secreções e pH, pelo sistema imunológico, inicial-  
741 mente pela imunidade inata [127].

742

## 2.9 Estudos Toxicológicos

Nos últimos anos, tem havido um aumento generalizado na utilização de plantas medicinais ou produtos naturais devido a seus efeitos potencialmente benéficos para a saúde humana. Muitas plantas podem ser eficazes, mas fitomedicamentos precisam ser exaustivamente investigado para detectar qualquer efeito tóxico. Isto é particularmente importante porque muitas plantas sintetizam substâncias tóxicas para a defesa contra vírus, bactérias e fungos, estes compostos podem ter potencial efeitos deletérios em seres humanos [128].

Em estudos de produtos naturais, para caracterizar o tipo do efeito tóxico, os seus benefícios e riscos, extrapola-se os efeitos a partir de estudos *in vitro* e em animais para os humanos [129].

No Brasil os estudos de toxicidade pré-clínica para fitoterápicos são normatizados pela Resolução N° 90/04 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que é baseada nas normas preconizadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) que recomenda que sejam realizados estudos de toxicidade aguda e de genotoxicidade quando houver uso contínuo e prolongado do medicamento em humanos [130].

Os testes para avaliação de toxicidade das substâncias químicas estão bem detalhados segundo os protocolos sugeridos pela Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD) [131].

Testes *in vivo* de toxicidade são importantes para que seja feita a observação dos efeitos dos extratos das plantas nos modelos animais utilizados. Destaca-se, o modelo utilizado de toxicidade aguda, os quais visam estabelecer um estudo que determina qual a espécie mais sensível e o índice de letalidade, onde os extratos, compostos ou frações são administrados em uma ou várias doses em um período de 24 horas [132].

### 2.9.1 Toxicidade Aguda

A toxicidade aguda aparece decorrente de uma única exposição ou de exposições múltiplas a agentes tóxicos em um período de tempo curto (até 24 horas), com manifestação imediata dos efeitos [131].

O teste de toxicidade aguda permite determinar a DL<sub>50</sub> (dose letal média) de uma substância, a qual corresponde à dose da substância que se estima que cause a morte de

776 50% dos animais da pesquisa. Ela é calculada estatisticamente com base nos resultados  
777 obtidos nos testes e seu valor é expresso em termos de peso da substância teste por unidade  
778 de peso do animal testado (mg/kg) [131]. A avaliação se dá não apenas com a morte de  
779 animais, mas também ao início, à natureza e a duração das intoxicações relacionadas á  
780 morte (observações clínicas), definindo também as doses para os exames de toxicidade  
781 subaguda, sendo a espécie escolhida o rato, embora possam ser utilizadas outras espécies  
782 de roedores. Normalmente são utilizadas as ratas fêmeas por proporcionarem maior sensi-  
783 bilidade, nulíparas e não-prenhas, com idade compreendida entre 8 a 12 semanas [131].

784 Quando o material de ensaio é de baixa toxicidade, utiliza-se como limite do teste a  
785 dose de 2000 mg/kg em um único animal. Se o animal sobreviver, a mesma dose deve ser  
786 administrada a mais quatro animais, em intervalos de aproximadamente 48 horas. A DL<sub>50</sub> é  
787 considerada superior a 2000 mg/kg quando três ou mais animais do total de cinco sobrevi-  
788 vem. Quando há o óbito do primeiro animal, ou então três ou mais animais vão a óbito  
789 durante o tratamento, doses mais baixas devem ser testadas para que seja possível estabele-  
790 cer a DL<sub>50</sub> [131].

791 Se o produto a ser testado apresentar pouca ou nenhuma informação acerca da toxi-  
792 cidade, deve-se iniciar o tratamento com uma dose mais baixa. Para estabelecer a dose para  
793 o início dos testes, devem-se considerar todas as informações disponíveis tais como: in-  
794 formações gerais sobre a substância teste, resultados de quaisquer outros ensaios de toxici-  
795 dade e resultados de ensaios com materiais estruturalmente relacionados. Com tais infor-  
796 mações, estabelece-se uma estimativa de DL<sub>50</sub>. No primeiro animal será administrada uma  
797 dose abaixo da preconizada. Se o animal sobreviver, o segundo animal recebe uma dose  
798 mais elevada, mas se ocorrer a morte do animal ou ele apresentar sinais de toxicidade, o  
799 segundo animal receberá uma dose mais baixa. O fator de progressão da dose deve ser es-  
800 colhido e mantido constante ao longo do estudo. Usualmente, utiliza-se fator de 3,2 (se-  
801 quência de 1,75 , 5,5 , 17,5, 55 , 175, 550, 1750, 5000 mg/kg). Se nenhuma estimativa da  
802 letalidade da substância está disponível, a dosagem deve ser iniciada com 175 mg/kg  
803 [131].

804 Durante as primeiras 24 horas após a administração da substância teste os animais  
805 devem ser e observados periodicamente, posteriormente, no mínimo uma vez ao dia duran-  
806 te 14 dias. Sinais de toxicidade, incluindo tempo de aparecimento, progressão e reversibili-  
807 dade destes devem ser anotadas. Observa-se o maior número possível de parâmetros, base-  
808 ado no *screening* hipocrático (reflexos, estado consciente, atividade e coordenação do sis-

809 tema motor e tônus muscular, atividades sobre o sistema nervoso central e autônomo)  
810 [131].

811 Desde a 24<sup>a</sup> hora e até 14 dias após administração da dose, devem ser registrados a  
812 variação de peso e o consumo hídrico e de ração. Ao final do período de observação todos  
813 os animais sobreviventes devem ser submetidos à eutanásia e autopsiados. Caso sejam ob-  
814 servadas alterações nas autópsias, estudos histopatológicos dos órgãos acometidos devem  
815 ser realizados [130,132].

816

## 817 **2.10 Teste Genotóxico e Mutagênico**

818

819 Existe pouca informação sobre os efeitos genotóxicos da maior parte dos princípios  
820 ativos encontrados nas plantas. Os efeitos biológicos de extratos de plantas medicinais são  
821 complexo devido à presença de substâncias adicionais gerado durante o processamento  
822 e/ou através do uso de aditivos, uma vez que muitos componentes encontrados nas  
823 preparações industriais possam ser mutagênicos. É necessário avaliar se eles induzem  
824 danos no DNA (ácido desoxirribonucléico), afim de minimizar os riscos de lesões celulares  
825 durante o consumo humano [128].

826 Genotoxicidade é a capacidade que algumas substâncias têm de induzir alterações  
827 no material genético de organismos a elas expostos. Essas alterações são responsáveis pelo  
828 surgimento de cânceres e doenças hereditárias [133].

829 A grande maioria dos carcinógenos inicia sua atividade tumoral através de intera-  
830 ções com o DNA, o que resulta lesões genéticas permanentes, chamadas de mutações gên-  
831 cas e/ou mutações cromossômicas, que altera o ciclo celular, esses agentes que mudam a  
832 sequência do DNA são tóxicos ao gene, são capazes de induzir instabilidade cromossômi-  
833 ca, representadas por aberrações cromossômicas principalmente deleções, translocações,  
834 recombinações ou ganho ou perda de cromossomos inteiros. Estes eventos contribuem para  
835 o desenvolvimento de processos celulares malignos [134].

836 Os testes regulatórios da genética toxicológica constituem de uma série de testes de  
837 mutagenicidade, bem definidos, selecionados para detectar agentes químicos e físicos ca-  
838 pazes de induzir mutações, sendo as mutações frequentemente associadas com o desenvol-  
839 vimento de cânceres e defeitos do nascimento, e o conhecimento do potencial genotóxico  
840 de um agente químico industrializado, ou naturalmente presente no ambiente é uma infor-

841 mação essencial para as agências regulatórias, no que se refere ao estabelecimento de risco  
842 ao homem [129].

843 Os ensaios *in vivo* e *in vitro*, são capazes de detectar mutações (mutagenicidade) e  
844 alterações cromossômicas, usando plantas, mamíferos e inclusive o homem, sendo que os  
845 ensaios *in vitro* que utilizam células de mamíferos, têm a vantagem de possuir maior simi-  
846 laridade com o ser humano e, conseqüentemente, com mutações importantes na etiologia  
847 de doenças degenerativas como o câncer e doenças genéticas [133, 134].

848 Recentemente um crescente número de pesquisas tem indicado o ensaio de linfoma  
849 de camundongo (*Mouse lymphoma Assay*- MLA) como sendo o mais sensível dentre os  
850 sistemas que utilizam células de mamíferos. A maioria das alterações detectadas pelo  
851 ensaio é encontrada em células tumorais, sendo assim, presumivelmente relevantes na  
852 carcinogênese [129].

853 Agentes químicos ambientais são importantes fatores tanto em termos de desenvol-  
854 vimento como de prevenção do câncer. O fato de eventos mutagênicos serem de grande  
855 importância em carcinogenicidade sugere que certos cânceres humanos podem ser preve-  
856 nidos pela identificação de agentes mutagênicos no ambiente [135].

857 Os ensaios biológicos mais usuais para avaliar a genotoxicidade e mutagenicidade  
858 são os testes de cometa e micronúcleo em sangue periférico [136]. No entanto, testes de  
859 outras áreas têm mostrado importantes informações complementares e há uma tendência  
860 em desenvolver juntamente com os ensaios clássicos de mutagênese os testes de apoptose,  
861 fagocitose esplênica. Assim, estes ensaios permitem uma avaliação dos efeitos toxicogêné-  
862 ticos e imunomodulatórios de novos compostos naturais e/ou sintéticos [137].

863

### 864 **2.10.1 Ensaio do Cometa**

865

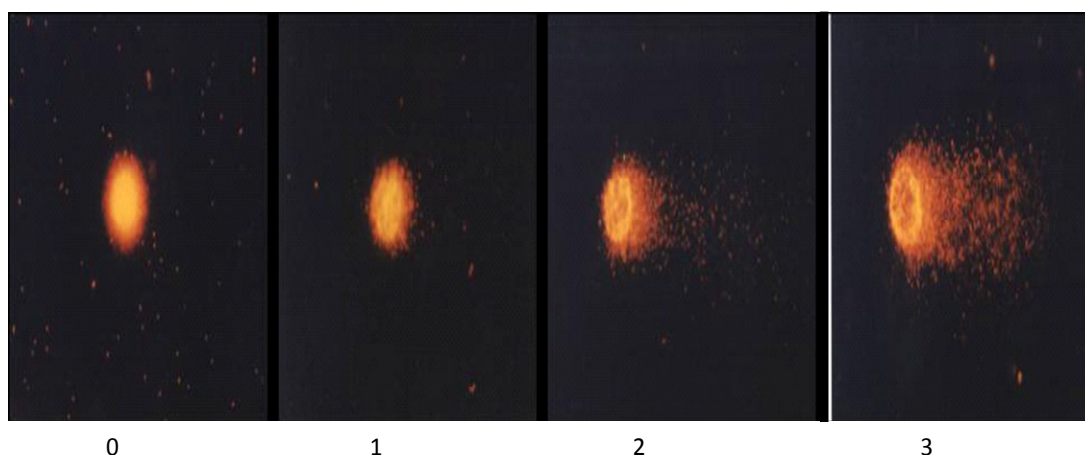
866 O teste do cometa visa evidenciar a corrida de fragmentos de DNA em relação ao  
867 núcleo principal, quando esse é submetido a uma corrente eletroforética, produzindo figu-  
868 ras semelhantes a cometas [133].

869 O comportamento do DNA em células individualizadas leva em conta a sua organi-  
870 zação dentro do núcleo. Para ser compactado, após seu enovelamento com proteínas histó-  
871 nicas, o DNA forma alça as quais são aderidas a uma rede protéica. Se células embebidas  
872 em agarose tiverem suas membranas lisadas por detergentes e suas proteínas extraídas, o  
873 DNA maior e mais pesado ocupará o espaço no gel, anteriormente preenchido por toda a

874 célula, permanecendo retido numa estrutura residual semelhante a um núcleo designada  
875 como nucleóide [138].

876 A aparência de cada nucleóide quando submetido a eletroforese, ou seja, com o  
877 seu DNA danificado levou Olive [139] a sugerir o nome de "*comet assay*" (teste do come-  
878 ta), sendo que os fragmentos que são transportados para fora do nucleóide, pela eletrofore-  
879 se, resultam em uma imagem que remete a um cometa, com cabeça e cauda.

880 Os cometas gerados pela técnica podem ser analisados visualmente, utilizando-se  
881 coloração com um agente intercalante fluorescente: o Brometo de Etídio, e um microscó-  
882 pio de fluorescência. Desta forma os cometas poderão ser classificados em: classe 0 – nu-  
883 cleóides não danificados e que não apresentam cauda; classe 1 – nucleóides com cauda  
884 menor que o diâmetro do nucleóide; classe 2 – nucleóides com cauda de tamanho entre 1 a  
885 2 vezes o diâmetro do nucleóide; classe 3 – nucleóides com cauda 2 vezes maior que o  
886 diâmetro do nucleóide (figura 6). Nucleóides de células apoptóticas, que apresentam total-  
887 mente fragmentados geralmente não são contabilizados [140].



888 0 1 2 3  
889 **Figura 6:** Critério de classificação para análise do Ensaio do Cometa. Coloração: Brometo de  
890 Etídeo. Microscopia de fluorescência, objetiva 40X.

891 **FONTE:** Gentox [141]

892

893

### 894 **2.10.2 Ensaio de Micronúcleo**

895

896 Os micronúcleos em sangue periférico são amplamente utilizados para quantificar  
897 as lesões no DNA. Os danos são resultantes da exposição a agentes exógenos, e não são  
898 corrigidos pelos mecanismos intracelulares de reparo. Desta maneira, o ensaio de micronú-  
899 cleo permite a avaliação da capacidade carcinogênica de um composto, *in vivo* e *in vitro*  
900 [136].

901 É o ensaio *in vivo* mais amplamente utilizado para a detecção de agentes clastogê-  
902 nicos (que quebram cromossomos), e de agentes aneugênicos (que induzem aneuploidia ou  
903 segregação cromossômica anormal) [136]. Camundongos e ratos são as espécies mais usa-  
904 das, por causa do uso comum em pesquisas toxicológicas, e da disponibilidade de dados  
905 para a indução de micronúcleo usando-se uma grande variedade de agentes químicos.  
906 Quando a análise envolver sangue periférico, recomenda-se que camundongos sejam utili-  
907 zados [129].

908 Micronúcleos são frequentemente usados para quantificar a exposição a agentes  
909 químicos ou físicos, sendo um procedimento importante e sugerido, por agências de pes-  
910 quisa da área de genética toxicológica, na avaliação da capacidade cancerígena de um  
911 composto [142].

912 Os micronúcleos constituem-se como um dos primeiro sinais de alterações cromos-  
913 sômicas e desse modo aparece em números elevados antes de qualquer outro sintoma. Para  
914 a realização do teste do micronúcleo *in vivo*, os tipos celulares mais utilizados são os eri-  
915 trócitos [136].

916 Segundo Schmid [143], é adequado que os micronúcleos sejam avaliados a partir de  
917 hemácias jovens, pois os núcleos de eritroblastos são expelidos, e ao transformarem-se em  
918 eritrócitos, estes permanecem no citoplasma. Podendo assim, ser identificados, baseando-  
919 se em sua morfologia arredondada e coloração amarelo-esverdeada causada pela ligação do  
920 corante alaranjado de acridina com as fitas duplas de DNA. Já o citoplasma, rico em RNA,  
921 é evidenciado em vermelho devido à ligação à fita simples (figura 7).



922  
923 **Figura 7:** Evidência de micronúcleo em eritrócito de sangue periférico.

924 **FONTE:** Almeida [144]

925  
926  
927

## 2.11 Ensaio para Detecção de Apoptose

928

929

930 A maioria dos tecidos sofre um constante processo de renovação celular graças ao  
931 equilíbrio entre proliferação e morte das células, caracterizada por um processo ativo de  
932 alterações morfológicas e bioquímicas, a apoptose [145].

933

934

935

936

937

938

939

940

941

942

943

A apoptose é também um mecanismo de defesa, que é ativado sempre que ocorre uma invasão por agentes patogênicos, ou ainda quando o DNA for lesado, sendo uma via de morte celular programada e que assegura a manutenção da homeostase dos organismos multicelulares. Na fase inicial, há condensação do citoplasma, seguida da condensação do núcleo, e fragmentação do DNA em oligômeros enquanto que na fase final do processo apoptótico, as células se fragmentam inteiramente formando os corpos apoptóticos que posteriormente são reconhecidos e fagocitados por macrófagos ativos, sendo considerado um eficiente mecanismo para a eliminação de células com alterações genéticas auxiliando na prevenção de tumores. Deste modo, falhas da apoptose podem interferir na regulação do ciclo celular levando a proliferação celular excessiva e aumento de células com lesões [137].

944

945

946

947

O ensaio citológico para detecção de apoptose é baseado em alterações morfológicas intracelulares. Essas alterações tornam-se visíveis por meio de corantes do DNA, sendo amplamente utilizado o Laranja de Acridina, uma vez que constitui um procedimento simples, de baixo custo e usual em ensaios toxicogenéticos [137].

948

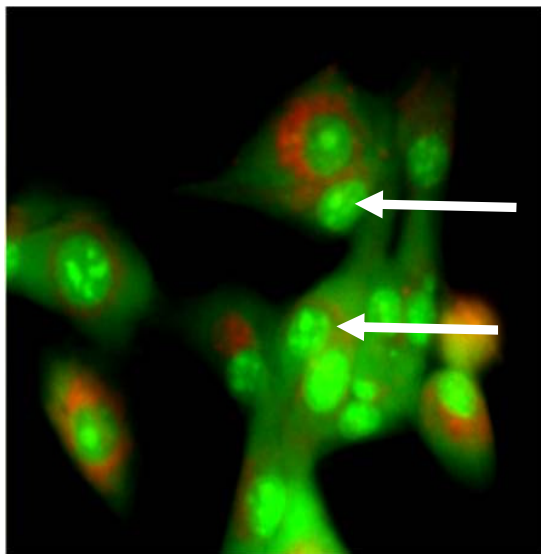
949

950

951

Quando o Laranja de Acridina se intercala no DNA, proporciona coloração verde sob microscopia de fluorescência. Este corante também se liga ao RNA, mas como não se intercala, o RNA é corado em vermelho-alaranjado. Assim, uma célula viável apresenta um núcleo esverdeado e um citoplasma vermelho [146], mostrado na figura 8.





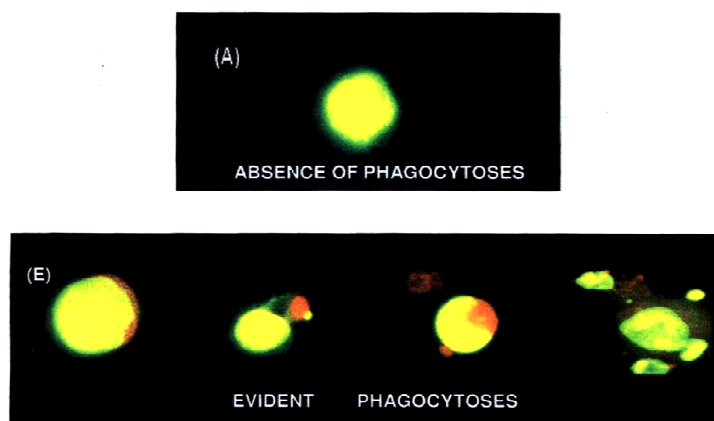
**Figura 8:** Células apoptóticas coradas com laranja de acridina.

**FONTE:** Cheila [147]

## 2.12 Ensaio de Fagocitose Esplênica

A fagocitose consiste na primeira linha de defesa do organismo na remoção de microorganismos ou partículas estranhas. Este processo envolve o reconhecimento dos antígenos por receptores de superfície em células fagocíticas [146]. Por isso, vários receptores específicos, mediadores da fagocitose são encontrados especialmente em macrófagos, neutrófilos e monócitos que são as células diretamente envolvidas no processo [148].

A regulação da fagocitose protege o organismo de inflamações e pode ser realizada por citocinas pró-inflamatórias. Dentre outras funções atribuídas às células fagocíticas, destacam-se ainda a capacidade de remodelamento e a homeostase do número de células no organismo além de exercerem importante função na retirada de células com lesão do DNA da corrente sanguínea por meio do baço que é o maior órgão linfóide em mamíferos [149]. A ausência ou presença de fagocitose mostrada na figura 9 é baseada pela técnica de Hayashi *et al* [136], o qual utiliza o alaranjado de acridina como corante.



**Figura 9:** Teste para detecção de fagocitose, onde (A) ausência de fagocitose e (B) evidenciando a fagocitose

**FONTE:** Boatright e Salvasen [150]

### 2.13 Considerações finais

O AU é o produto final do catabolismo das purinas e seus níveis acima dos valores de referência levam a um quadro de HU e pode evoluir para a gota. Além do que, a HU crônica é um fator de risco independente para hipertensão, SM, DRC e doenças cardiovasculares.

Nesta revisão bibliográfica, foi observada que a prevalência da HU na população mundial tem aumentado de forma constante ao longo dos últimos 40 anos e estudos indicam que o tratamento da gota continua a ser insuficiente, demonstrado a necessidade da utilização de novas terapias, com a finalidade de reduzir o número de pacientes com intolerância às terapias existentes e criando oportunidades para uma melhor individualização do tratamento, visto que, as assistências médicas não devem ser limitadas a uma única prescrição de drogas.

Além disso, tem-se ressaltado a importância dos estudos das plantas usadas na medicina popular com o objetivo de verificar tanto seu possível efeito terapêutico, como também a possível presença de substâncias tóxicas. Os flavonóides presentes nos extratos das folhas das plantas têm mostrado atividade antioxidante e atividade na redução dos níveis AUs, além de atuarem também como um inibidor de nucleação e do crescimento de cristais de AU, o que pode torná-la clinicamente útil no tratamento da HU e litíase por AU.

996           A *E.macrophyllus* , é uma planta medicinal que cresce abundantemente no Brasil,  
997 encontrada em todo o território nacional apresentando em suas folhas compostos de polife-  
998 nóis, flavonóides e diterpenos, o que nos leva a considerar que através dos flavonóides  
999 presentes nos extratos ela possa ter a sua ação a ser comprovada na HU e profilaxia da go-  
1000 ta. A *E.macrophyllus* é relatada nas edições da farmacopéia no início e meio do século  
1001 passado (1929 – 1959) e com uso popular para várias doenças, mas com poucos estudos  
1002 científicos sobre seus efeitos fitoterápicos, sua composição química, atividade farmacoló-  
1003 gica e toxicológica, visto que, existe comprovação apenas em relação a sua ação imunopro-  
1004 tetora, anti-inflamatória e nefroprotetora.

1005           Frente a essas informações relevantes, faz-se necessário a realização de testes na  
1006 *E.macrophyllus* que confirmem o seu uso empírico frente à HU, bem como analisar o po-  
1007 tencial antimicrobiano frente às cepas já testadas e a outras, o seu efeito toxicológico e  
1008 genotóxico e mutagênico, uma vez que diferentes terapias devem ser avaliadas adequada-  
1009 mente, observando seus efeitos colaterais, dentre elas, alterações nas moléculas de DNA  
1010 que podem, também, relacionar-se ao aparecimento de neoplasias.

1011

1012

1013

1014

1015

1016

1017

1018

1019

1020

1021

1022

1023

1024

1025

1026

1027

1028 **3. OBJETIVOS**

1029

1030

1031 **3.1 Objetivo Geral**

1032

1033 -Avaliar o efeito anti-hiperuricêmico do extrato etanólico das folhas da planta *E-*  
1034 *chinodurus macrophyllus* em modelos experimentais induzidos pelo ácido oxônico e avali-  
1035 ar o seu potencial genotóxico e mutagênico.

1036

1037 **3.2 Objetivos Específicos**

1038

1039 -Analisar a composição química do extrato bruto das folhas da *Echinodorus ma-*  
1040 *crophyllus*;

1041 -Comparar a uricemia e uricosúria dos grupos controles e tratados após o experi-  
1042 mento;

1043 -Determinar a DL<sub>50</sub> após administração aguda, do extrato das folhas da *Echinodo-*  
1044 *rus macrophyllus* em modelo animal.

1045 -Avaliar os parâmetros comportamentais, fisiológicos, e histopatológicos nos ani-  
1046 mais tratados com o extrato das folhas da *Echinodorus macrophyllus*.

1047 -Avaliar pelo Teste do Cometa e Micronúcleo o potencial genotóxico e mutagênico  
1048 do extrato obtido das folhas da *Echinodorus macrophyllus* em células de mamíferos.

1049 - Avaliar a atividade imunomodulatória pela fagocitose e a morte celular através de  
1050 apoptose após a administração da *Echinodorus macrophyllus in vivo*.

1051 -Determinar o potencial antimicrobiano *in vitro* do extrato das folhas da *Echinodo-*  
1052 *rus macrophyllus* frente às cepas ATCCs de fungos e bactérias, através do teste de Concen-  
1053 tração Inibitória Mínima (CIM);

1054

1055

1056

1057

1058

1059

1060

#### 4. REFERÊNCIAS

1061

- 1062 1. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchel RN. Sistema musculoesquelético. In:  
1063 Patologia básica. São Paulo-SP. 8a ed. Elsevier 2008. p896.  
1064
- 1065 2 McLean M & Becker MA. Etiology and pathogenesis of gout. In Hochberg MC,  
1066 Silman AJ, Smolen JS, Weinblatt ME, Weisman MH. Rheumatology. 5<sup>a</sup> ed. Phila-  
1067 delphia –EUA Mosby Elsevier 2014;1841-57.  
1068
- 1069 3 Roddy E, Doherty M. Epidemiology of gout. Arthritis Res Ther 2010;12(6):223.  
1070
- 1071 4 Zhu Y, Pandya BJ, Choi HK. Comorbidities of gout and hyperuricemia in the US  
1072 general population: NHANES 2007-2008. Am J Med 2012;125(7):679-87.  
1073
- 1074 5 Rho YH, Choi SJ, Lee YH, *et al.* The prevalence of metabolic syndrome in patients  
1075 with gout: a multicenter study. J Korean Med Sci 2005;20(6):1029-33.  
1076
- 1077 6. Choi HK, Mount DB, Reginato AM, Physicians ACo, Society AP. Pathogenesis of  
1078 gout. Ann Intern Med 2005;143(7):499-516.  
1079
- 1080 7. Bardin T, Richette P. Definition of hyperuricemia and gouty conditions. Curr Opin  
1081 Rheumatol 2014;26(2):186-91.  
1082
- 1083 8. Gutiérrez-Macías A, Lizarralde-Palacios E, Martínez-Odrizola P, Miguel-De la  
1084 Villa F. Fatal allopurinol hypersensitivity syndrome after treatment of  
1085 asymptomatic hyperuricaemia. BMJ 2005;331(7517):623-4.  
1086
- 1087 9. Richette P, Bardin T. Gout. Lancet 2010;375(9711):318-28.  
1088
- 1089 10 Perez-Ruiz F, Alonso-Ruiz A, Calabozo M, *et al.* Efficacy of allopurinol and  
1090 benzbromarone for the control of hyperuricaemia. A pathogenic approach to the  
1091 treatment of primary chronic gout. Ann Rheum Dis 1998;57(9):545-9.  
1092
- 1093 11 Albuquerque UP, Hanazaki N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos  
1094 fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. Revista  
1095 Brasileira de Farmacognosia 2006;16:678-89.  
1096
- 1097 12 Leite JPV, Pimenta DS, Gomes RSDL, Dantas-Barros AM. Contribuição ao estudo  
1098 farmacobotânico da *Echinodorus macrophyllus* (Kunth) Micheli (chapéu-de-couro)  
1099 - Alismataceae. In; Brazilian Journal of Pharmacognosy 2007;17(2): 242-8.  
1100
- 1101 13 Buznego MT, Pérez-Saad H. Behavioral and antiepileptic effect of acute  
1102 administration of the extract of the aquatic plant *Echinodorus berteroi* (Sprengel)  
1103 Fassett (upright burhead). Epilepsy Behav 2006;9(1):40-5.  
1104
- 1105 14 Coimbra R 1994. Manual de fitoterapia. Belém: CEJUP.  
1106

- 1107 15 Pinto AC, Rego GC, Siqueira AM, *et al.* Immunosuppressive effects of  
1108 *Echinodorus macrophyllus* aqueous extract. J Ethnopharmacol 2007;111(2):435-9.  
1109
- 1110 16 Tanus-Rangel E, Santos SR, Lima JC, *et al.* Topical and systemic anti-  
1111 inflammatory effects of *Echinodorus macrophyllus* (Kunth) Micheli  
1112 (Alismataceae). J Med Food 2010;13(5):1161-6.  
1113
- 1114 17 Portella VG, Cosenza GP, Diniz LR, *et al.* Nephroprotective Effect of *Echinodorus*  
1115 *macrophyllus* Micheli on Gentamicin-Induced Nephrotoxicity in Rats. Nephron  
1116 Extra 2012;2(1):177-83.  
1117
- 1118 18. Velusami CC, Boddapati SR, Hongasandra S S, *et al.* Safety evaluation of turmeric  
1119 polysaccharide extract: assessment of mutagenicity and acute oral toxicity. Biomed  
1120 Res Int 2013;158-348.  
1121
- 1122 19 Egorov IV, Tsurko VV. [Renal affection in gout]. Ter Arkh 2012;84(1):65-8.  
1123
- 1124 20. Hayashi S, Fujiwara S, Noguchi T. Evolution of urate-degrading enzymes in animal  
1125 peroxisomes. Cell Biochem Biophys 2000;32:123-9.  
1126
- 1127 21. Wu XW, Muzny DM, Lee CC, Caskey CT. Two independent mutational events in  
1128 the loss of urate oxidase during hominoid evolution. J Mol Evol 1992;34(1):78-84.  
1129
- 1130 22. Hardman, J.G.; Limbird, L.E. Goodman & Gilman As Bases Farmacológicas da  
1131 Terapêutica. 11ª ed. Porto Alegre-RS: McGraw Hill-Artmed 2006. p517-25.  
1132
- 1133 23. Hak AE, Choi HK. Menopause, postmenopausal hormone use and serum uric acid  
1134 levels in US women--the Third National Health and Nutrition Examination Survey.  
1135 Arthritis Res Ther 2008;10(5):116.  
1136
- 1137 24. Edwards NL. Crystal-induced joint disease. ACP Medicine 2007;1-12.  
1138
- 1139 25. Dehghan A, Köttgen A, Yang Q, *et al.* Association of three genetic loci with uric  
1140 acid concentration and risk of gout: a genome-wide association study. Lancet  
1141 2008;372(9654):1953-61.  
1142
- 1143 26. Pak CY, Skurla C, Harvey J. Graphic display of urinary risk factors for renal stone  
1144 formation. J Urol 1985;134(5):867-70.  
1145
- 1146 27. Sakhaee K, Adams-Huet B, Moe OW, Pak CY. Pathophysiologic basis for  
1147 normouricosuric uric acid nephrolithiasis. Kidney Int 2002;62(3):971-9.  
1148
- 1149 28. Alvarez-Nemegyei J, Medina-Escobedo M, Villanueva-Jorge S, Vazquez-Mellado  
1150 J. Prevalence and risk factors for urolithiasis in primary gout: is a reappraisal  
1151 needed? J Rheumatol 2005;32(11):2189-91.  
1152
- 1153 29. Lin KC, Lin HY, Chou P. The interaction between uric acid level and other risk  
1154 factors on the development of gout among asymptomatic hyperuricemic men in a  
1155 prospective study. J Rheumatol 2000;27(6):1501-5.

- 1156  
1157 30. Nyhan WL. The recognition of Lesch-Nyhan syndrome as an inborn error of purine  
1158 metabolism. *J Inherit Metab Dis* 1997;20(2):171-8.  
1159
- 1160 31. Lin JL, Tan DT, Ho HH, Yu CC. Environmental lead exposure and urate excretion  
1161 in the general population. *Am J Med.* 2002;113(7):563-8.  
1162
- 1163 32. Pascual E, Perdiguero M. Gout, diuretics and the kidney. *Ann Rheum Dis*  
1164 2006;65(8):981-2.  
1165
- 1166 33. Caspi D, Lubart E, Graff E, Habet B, Yaron M, Segal R. The effect of mini-dose  
1167 aspirin on renal function and uric acid handling in elderly patients. *Arthritis Rheum*  
1168 2000;43(1):103-8.  
1169
- 1170 34. Marc Swiontkowski M, Lloyd RB, Unusual complications associated with gout.  
1171 *JBJS Case Connect S* 2014;4(3):81-8.  
1172
- 1173 35. Brasil. Ministério da Saúde. LER/DORT:Dilemas, polêmicas e dúvidas. Série a.  
1174 Normas e Manuais Técnicos. Brasília/ DF 2001.  
1175
- 1176 36. Yü TF, Berger L. Impaired renal function gout: its association with hypertensive  
1177 vascular disease and intrinsic renal disease. *Am J Med* 1982;72(1):95-100.  
1178
- 1179 37. Kramer HM, Curhan G. The association between gout and nephrolithiasis: the  
1180 National Health and Nutrition Examination Survey III, 1988-1994. *Am J Kidney*  
1181 *Dis* 2002;40(1):37-42.  
1182
- 1183 38. Pak CY, Barilla DE, Holt K, Brinkley L, Tolentino R, Zerwekh JE. Effect of oral  
1184 purine load and allopurinol on the crystallization of calcium salts in urine of  
1185 patients with hyperuricosuric calcium urolithiasis. *Am J Med* 1978;65(4):593-9.  
1186
- 1187 39. Takahashi S, Yamamoto T, Moriwaki Y, Tsutsumi Z, Higashino K. Impaired  
1188 lipoprotein metabolism in patients with primary gout--influence of alcohol intake  
1189 and body weight. *Br J Rheumatol* 1994;33(8):731-4.  
1190
- 1191 40. Culleton BF, Larson MG, Kannel WB, Levy D. Serum uric acid and risk for  
1192 cardiovascular disease and death: the Framingham Heart Study. *Ann Intern Med*  
1193 1999;131(1):7-13.  
1194
- 1195 41. Bo S, Cavallo-Perin P, Gentile L, Repetti E, Pagano G. Hypouricemia and  
1196 hyperuricemia in type 2 diabetes: two different phenotypes. *Eur J Clin Invest*  
1197 2001;31(4):318-21.  
1198
- 1199 42. Erickson AR, Enzenauer RJ, Nordstrom DM, Merenich JA. The prevalence of  
1200 hypothyroidism in gout. *Am J Med* 1994;97(3):231-4.  
1201
- 1202 43. Annemans L, Spaepen E, Gaskin M, et al. Gout in the UK and Germany:  
1203 prevalence, comorbidities and management in general practice 2000-2005. *Ann*  
1204 *Rheum Dis* 2008;67(7):960-6.

- 1205  
1206 44. Sun D, Li S, Zhang X, et al. Uric Acid is associated with metabolic syndrome in  
1207 children and adults in a community: the bogalusa heart study. PLoS One  
1208 2014;9(10):896-900.  
1209
- 1210 45. Wallace KL, Riedel AA, Joseph-Ridge N, Wortmann R. Increasing prevalence of  
1211 gout and hyperuricemia over 10 years among older adults in a managed care  
1212 population. J Rheumatol 2004;31(8):1582-7.  
1213
- 1214 46. Saag KG, Choi H. Epidemiology, risk factors, and lifestyle modifications for gout.  
1215 Arthritis Res Ther 2006;8  
1216
- 1217 47. Brasil. Ministério da Saúde. Informações da Saúde: Dados de Mortalidade.  
1218 Estatísticas Vitais. Disponível em: [http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/](http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0205)  
1219 [index.php?area=0205](http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0205). Acesso em 02/06/2015.  
1220
- 1221 48. Brasil. Ministério da Saúde. Informações da Saúde. Dados de Internações  
1222 Hospitalares no Brasil. Disponível em: [http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/](http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0205)  
1223 [index.php?area=0205](http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0205). Acesso em 07/04/2015.  
1224
- 1225 49. Yu KH, See LC, Huang YC, Yang CH, Sun JH. Dietary factors associated with  
1226 hyperuricemia in adults. Semin Arthritis Rheum 2008;37(4):243-50.  
1227
- 1228 50. Choi HK, Curhan G. Beer, liquor, and wine consumption and serum uric acid level:  
1229 the Third National Health and Nutrition Examination Survey. Arthritis Rheum  
1230 2004;51(6):1023-9.  
1231
- 1232 51. Villegas R, Xiang YB, Elasy T, *et al.* Purine-rich foods, protein intake, and the  
1233 prevalence of hyperuricemia: the Shanghai Men's Health Study. Nutr Metab  
1234 Cardiovasc Dis 2012;22(5):409-16.  
1235
- 1236 52. Borghi C, Rosei EA, Bardin T, *et al.* Serum uric acid and the risk of cardiovascular  
1237 and renal disease. J Hypertens 2015;1.  
1238
- 1239 53. Hamburger M, Baraf HS, Adamson TC, et al. 2011 Recommendations for the diag-  
1240 nosis and management of gout and hyperuricemia. Postgrad Med 2011;12:3-36.  
1241
- 1242 54. Steinberger J, Daniels SR, Eckel RH, *et al.* Progress and challenges in metabolic  
1243 syndrome in children and adolescents: a scientific statement from the American  
1244 Heart Association Atherosclerosis, Hypertension, and Obesity in the Young Com-  
1245 mittee of the Council on Cardiovascular Disease in the Young; Council on Cardio-  
1246 vascular Nursing; and Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism.  
1247 Circulation 2009;119(4):628-47.  
1248
- 1249 55. Singh A, Sharma P, Malla R, Singh S. Raised Uric acid level and fetal outcome.  
1250 Hypertensive Disorders of Pregnancy 2014;9(1).  
1251



- 1252 56. Rahman TTA. Prevalence of hyperuricemia among hospitalized elderly patients and  
1253 its association with metabolic syndrome. *Advances in Aging Research* 2014; 3:329-  
1254 37.  
1255
- 1256 57. Choi HK, Mount DB, Reginato AM, Physicians ACo, Society AP. Pathogenesis of  
1257 gout. *Ann Intern Med* 2005;143(7):499-516.  
1258
- 1259 58. Chachá RCV & Louzada JR P. Monoartrite e poliartrite aguda. *Medicina RP* 2003;  
1260 36, 418-426.  
1261
- 1262 59. Cal-Kocikowska J, Nawrocka M, Bogdański P. [Gout - from pathogenesis to  
1263 treatment - progress in the XXI century]. *Pol Merkur Lekarski* 2015;38(228):354-9.  
1264
- 1265 60. Bardin T, Schiavon, Punzi L. Crystal arthropathies. In textbook on rheumatic  
1266 disease. 2a ed. London-UK: BJM 2012.344-58.  
1267
- 1268 61. Neogi T. Interleukin-1 antagonism in acute gout: is targeting a single cytokine the  
1269 answer? *Arthritis Rheum.* 2010;62(10):2845-9.  
1270
- 1271 62. Schlesinger N, Schumacher R , Catton M, Maxwell L. Colchicine for acute gout  
1272 (Cochrane Review). In *The Cochrane Library (Oxford):Update Software.* 2007.  
1273
- 1274 63. Wannmacher L. Anti-inflamatorios nao esteroides. In: Wannmacher L FM. Rio de  
1275 Janeiro-RJ: Guanabara Koogan; 2007.p254-60.  
1276
- 1277 64. Khanna D, Fitzgerald JD, Khanna PP, et al. 2012 American College of  
1278 Rheumatology guidelines for management of gout. Part 1: systematic  
1279 nonpharmacologic and pharmacologic therapeutic approaches to hyperuricemia.  
1280 *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2012;64(10):1431-46.  
1281
- 1282 65. Zhang W, Doherty M, Bardin T, et al. EULAR evidence based recommendations  
1283 for gout. Part II: Management. Report of a task force of the EULAR Standing  
1284 Committee for International Clinical Studies Including Therapeutics (ESCISIT).  
1285 *Ann Rheum Dis* 2006;65(10):1312-24.  
1286
- 1287 66. Perez-Ruiz F, Calabozo M, Pijoan JI, Herrero-Beites AM, Ruibal A. Effect of  
1288 urate-lowering therapy on the velocity of size reduction of tophi in chronic gout.  
1289 *Arthritis Rheum* 2002;47(4):356-60.  
1290
- 1291 67. Linhart A, Rob D. The role of uric acid and allopurinol therapy in cardiovascular  
1292 disease. *Vnitr Lek* 2015;61(5):421-30.  
1293
- 1293 68. Manger B. Uricosuric agent benzbromarone vs allopurinol:comarable effect. *Dtsch*  
1294 *Med Wochenschr* 2015;140(8):562.  
1295
- 1296 69. Bardin T. Current management of gout in patients unresponsive or allergic to  
1297 allopurinol. *Joint Bone Spine* 2004;71(6):481-5.  
1298
- 1299 70. Frampton JE. Febuxostat: a review of its use in the treatment of hyperuricaemia in  
1300 patients with gout. *Drugs* 2015;75(4):427-38.

- 1301  
1302 71 Mayer MD, Khosravan R, Vernillet L, Wu JT, Joseph-Ridge N, Mulford DJ.  
1303 Pharmacokinetics and pharmacodynamics of febuxostat, a new non-purine selective  
1304 inhibitor of xanthine oxidase in subjects with renal impairment. *Am J Ther*  
1305 2005;12(1):22-34.  
1306
- 1307 72 Kumar S, Ng J, Gow P. Benzbromarone therapy in management of refractory gout.  
1308 *N Z Med J* 2005;118(1217):528.  
1309
- 1310 73 Perez-Ruiz F, Calabozo M, Fernandez-Lopez MJ, et al. Treatment of chronic gout  
1311 in patients with renal function impairment: an open, randomized, actively  
1312 controlled study. *J Clin Rheumatol* 1999;5(2):49-55.  
1313
- 1314 74. Crittenden DB, Pillinger MH. New therapies for gout. *Annu Rev Med*  
1315 2013;64:325-37.  
1316
- 1317 75. Holdsworth MT, Nguyen P. Role of i.v. allopurinol and rasburicase in tumor lysis  
1318 syndrome. *Am J Health Syst Pharm* 2003;60(21):2213-22.  
1319
- 1320 76. Garay RP, El-Gewely MR, Labaune JP, Richette P. Therapeutic perspectives on  
1321 uricases for gout. *Joint Bone Spine* 2012;79(3):237-42.  
1322
- 1323 77. Takahashi S, Moriwaki Y, Yamamoto T, *et al.* Effects of combination treatment  
1324 using anti-hyperuricaemic agents with fenofibrate and/or losartan on uric acid  
1325 metabolism. *Ann Rheum Dis* 2003;62(6):572-5.  
1326
- 1327 78. Huang HY, Appel LJ, Choi MJ, *et al.* The effects of vitamin C supplementation on  
1328 serum concentrations of uric acid: results of a randomized controlled trial. *Arthritis*  
1329 *Rheum* 2005;52(6):1843-7.  
1330
- 1331 79 Borstad GC, Bryant LR, Abel MP, Scroggie DA, Harris MD, Alloway JA.  
1332 Colchicine for prophylaxis of acute flares when initiating allopurinol for chronic  
1333 gouty arthritis. *J Rheumatol* 2004;31(12):2429-32.  
1334
- 1335 80 Sarawate CA, Brewer KK, Yang W, et al. Gout medication treatment patterns and  
1336 adherence to standards of care from a managed care perspective. *Mayo Clin Proc*  
1337 2006;81(7):925-34.  
1338
- 1339 81. Filho VC, Yunes RA. Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal  
1340 Moderna. Chapecó- SC: Editora Argos; 2005;23.  
1341
- 1342 82. Murugaiyah V, Chan KL. Mechanisms of antihyperuricemic effect of *Phyllanthus*  
1343 *niruri* and its lignan constituents. *J Ethnopharmacol* 2009;124(2):233-9.  
1344
- 1345 83. Cosenza GP. Efeito do extrato bruto das folhas de *Echinodorus macrophyllus* e de  
1346 frações semipurificadas sobre a função renal em ratos com necrose tubular aguda  
1347 induzida por gentamicina. Dissertação de mestrado. Belo Horizonte-MG.  
1348 Universidade Federal de Minas Gerais; 2010.  
1349

- 1350 84. World Health Organization – WHO. Traditional Medicine Strategy 2002-2005.  
1351 Geneva: World Health Organization 2007;74.  
1352
- 1353 85. Fonseca MCM. Epamig pesquisa, produção de plantas medicinais para aplicação no  
1354 SUS. Espaço produtor, Viçosa, 2012, in: Carneiro, FM, Silva, MJP, Borges LL, Al-  
1355 bernaz LC, Costa JDP. Tendências dos estudos com plantas medicinais no Brasil.  
1356 Revista Sapiência: sociedade, saberes e práticas educacionais 2014;3(2): 44-75.  
1357
- 1358 86. Souza AF. Atividade diária e (in) atividade física na sociedade indígena terena:  
1359 Aldeias Buriti e Córrego do Meio. Dissertação de Mestrado. Campinas-SP.  
1360 Universidade Estadual de Campinas. 2008.  
1361
- 1362 87. López-Lázaro M. Flavonoids as anticancer agents: structure-activity relationship  
1363 study. Curr Med Chem Anticancer Agents 2002;2(6):691-714.  
1364
- 1365 88. Kong LD, Yang C, Ge F, Wang HD, Guo YS. A Chinese herbal medicine Ermiao  
1366 wan reduces serum uric acid level and inhibits liver xanthine dehydrogenase and  
1367 xanthine oxidase in mice. J Ethnopharmacol 2004;93(2-3):325-30.  
1368
- 1369 89. Ahmad NS, Farman M, Najmi MH, Mian KB, Hasan A. Pharmacological basis for  
1370 use of *Pistacia integerrima* leaves in hyperuricemia and gout. J Ethnopharmacol  
1371 2008;117(3):478-82.  
1372
- 1373 90. Grases F, Rodriguez A, Costa-Bauza A. Theobromine inhibits uric Acid  
1374 crystallization. A potential application in the treatment of uric Acid nephrolithiasis.  
1375 PLoS One 2014;9(10):111-184.  
1376
- 1377 91. Souza MR, Paula CA, Resende MLP, Grabe-Guimarães A, Souza Filho JD, Saúde-  
1378 Guimarães DA. Pharmacological basis for use of *Lychnophora trichocarpa* in  
1379 gouty arthritis: anti-hyperuricemic and anti-inflammatory effects of its extract,  
1380 fraction and constituents. J Ethnopharmacol 2012;142(3):845-50.  
1381
- 1382 92. Jang IT, Hyun SH, Shin JW, *et al.* Characterization of an Anti-gout Xanthine  
1383 Oxidase Inhibitor from *Pleurotus ostreatus*. Mycobiology 2014;42(3):296-300.  
1384
- 1385 93. Chen L, Yin H, Lan Z, *et al.* Anti-hyperuricemic and nephroprotective effects of  
1386 *Smilax china* L. J Ethnopharmacol 2011;135(2):399-405.  
1387
- 1388 94. Kuo C, Kao E, Chan K, *et al.* *Hibiscus sabdariffa* L. extracts reduce serum uric  
1389 acid levels in oxonate-induced rats. Journal Of Functional Foods 2012;4:375-81.  
1390
- 1391 95. Rego SCA. Alismataceae no Rio Grande do Sul, Porto Alegre. Dissertação de  
1392 Mestrado. Porto Alegre - RS. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 1988;  
1393 128.  
1394
- 1395 96. Farmacopéia Brasileira. 4º edição. São Paulo - SP: Atheneu. 1988-1996.  
1396

- 1397 97. Souza V.C.; Lorenzi H. Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação das  
1398 famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa,  
1399 SP, Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda 2005.  
1400
- 1401 98. Haynes RR, Holm-Nielsen LB. The Alismataceae. Flora Neotropica. Monograph  
1402 64. New York, The New York Botanical Garden 1994.  
1403
- 1404 99. Pansarin EP, Amaral MCE. Alismataceae. In: Wanderley *et al.*(Coord.). Flora  
1405 fanerogâmica do Estado de São Paulo. v. 4, São Paulo, FAPESP/RIMA, 2005.  
1406
- 1407 100. Brugiolo SSS. Avaliação da toxicidade do extrato aquoso liofilizado de chapéu-de-  
1408 couro em ratas prenhes. Tese. Juiz de Fora-MG. Universidade Federal de Juíz de  
1409 Fora 2010.  
1410
- 1411 101. Martins ER, Castro DM, Castellani DC, Dias JE. Plantas medicinais. Viçosa - MG:  
1412 Editora UFV 2000.  
1413
- 1414 102. Vaz APA, Jorge MHA. Chapéu de Couro. In: Ministério da Agricultura. Ed. Serié  
1415 Plantas Mediciniais ,Condimentares e Aromáticas. Corumbá-MS; 2006:1.  
1416
- 1417 103. Shigemori H, Shimamoto S, Sekiguchi M, Ohsaki A, Kobayashi J. Echinodolides A  
1418 and B, new cembrane diterpenoids with an eight-membered lactone ring from the  
1419 leaves of *Echinodorus macrophyllus*. J Nat Prod 2002;65(1):82-4.  
1420
- 1421 104. Bruneton J. Farmacognosia, fitoquímica, plantas medicinais. Tradução Ángel Villar  
1422 del Fresno. 2. ed. Zaragoza, Acribia, 2001.  
1423
- 1424 105. Kobayashi J, Sekiguchi M, Shimamoto S, Shigemori H, Ohsaki A. Echinophyllins  
1425 C-F, new nitrogen-containing clerodane diterpenoids from *Echinodorus*  
1426 *macrophyllus*. J Nat Prod 2000;63(11):1576-9.  
1427
- 1428 106. Mo SF, Zhou F, Lv YZ, *et al.* Hypouricemic action of selected flavonoids in mice:  
1429 structure-activity relationships. Biol Pharm Bull 2007;30(8):1551-6.  
1430
- 1431 107. Nunes GP, Silva MFd, Resende UM, Siqueira JMd. Plantas medicinais  
1432 comercializadas por raizeiros no Centro de Campo Grande, Mato Grosso do Sul.  
1433 Revista Brasileria de Farmacognosia 2003;13:83-92.  
1434
- 1435 108. Nascimento EL, Watanabe M, Fonseca CD, Schlottfeldt FS, Vattimo MFF.  
1436 Renoprotective effect of the *Echinodorus macrophyllus* in induced renal injury  
1437 .Enferm.2014; 27(1):12-7.  
1438
- 1439 109. Abbas Ak, Lichtman AH, Pillai S. Imunologia celular e molecular. Tradução  
1440 Claudia Reali. Rio de Janeiro-RJ: Elsevier. 2008.  
1441
- 1442 110. Mariot MP, Barberi RL. Metabólitos secundários e propriedades medicinais da  
1443 espíneira-santa. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais 2007;9:89-99.  
1444

- 1445 111. Davison HC, Low JC, Woolhouse ME. What is antibiotic resistance and how can  
1446 we measure it? Trends Microbiol 2000;8(12):554-9.  
1447
- 1448 112. Taylor PW. Alternative natural sources for a new generation of antibacterial agents.  
1449 Int J Antimicrob Agents 2013;42(3):195-201.  
1450
- 1451 113. Nascimento GGF; Locatelli J, Freitas PC; Silva GL. Antibacterial activity of plants  
1452 extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. Brazilian Journal of  
1453 Microbiology 2000;31:247-256.  
1454
- 1455 114. Wise, Richard. The urgent need for new antibacterial agents. Journal of  
1456 Antimicrobial Chemotherapy 2011;23.  
1457
- 1458 115. Fox, J. F. Although some dazzling technical approaches have fallen short, dozens of  
1459 small companies and a few major pharmas seek new products for this medically  
1460 crucial, modest-growth market. Nature Biotechnology 2006;24(12):1521- 1528.  
1461
- 1462 116. Baba SA, Malik SA. Evaluation of antioxidant and antibacterial activity of  
1463 methanolic extracts of *Gentiana kurroo* royle. Saudi J Biol Sci 2014;21(5):493-8.  
1464
- 1465 117. Lorian V. Antibiotics in Laboratory Medicine. 5 ed. Philadelphia: Lippincott  
1466 Williams & Wilkins, 2005.  
1467
- 1468 118. Vidal LS, Alves AM, Kuster RM, Lage C, Leitão AC. Genotoxicity and  
1469 mutagenicity of *Echinodorus macrophyllus* (chapéu-de-couro) extracts. Genet Mol  
1470 Biol 2010;33(3):549-57.  
1471
- 1472 119. Júnior IFS, Rangel TE, Santos SR, Lima JCS, Martins DTO. Avaliação da ativi-  
1473 dade antibacteriana dos extratos hidroalcoólicos de *Aspidosderma subincanum* Mart  
1474 (Guatambu) e *Echinodorus macrophyllus* Michell (chapéu de couro) pelo método  
1475 de microdiluição. In anais: 13º Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. Manaus-  
1476 AM. 2004;136.  
1477
- 1478 120. Brown PD, Ngeno C. Antimicrobial resistance in clinical isolates of  
1479 *Staphylococcus aureus* from hospital and community sources in southern  
1480 Jamaica. International Journal of Infectious Diseases 2007;11:220-5.  
1481
- 1482 121. Iwatsuki K, Yamasaki O, Morizane S, Oono T. Staphylococcal cutaneous  
1483 infections: invasion, evasion and aggression. J Dermatol Sci 2006;42(3):203-14.  
1484
- 1485 122. Albert MJ, Faruque SM, Faruque AS, *et al.* Controlled study of *Escherichia coli*  
1486 diarrheal infections in Bangladeshi children. J Clin Microbiol 1995;33(4):973-7.  
1487
- 1488 123. Marra RA, Bar K.; Bearman GML; Wenzel RP, Edmond MB. Systemic  
1489 inflammatory response syndrome in adult patients with nosocomial blood of  
1490 infection due to *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of infection 2006;53:30-35.  
1491

- 1492 124. Tibbetts RJ, Lin TL, Wu CC. Phenotypic evidence for inducible multiple  
1493 Antimicrobial resistance in *Salmonella choleraesuis*. FEMS Microbiology Letters  
1494 2002;218:333-338.  
1495
- 1496 125. Ho WL, Chou CC. Effects of carbon and nitrogen sources, sodium chloride and  
1497 culture conditions on cytotoxin production by *Salmonella choleraesuis*. Int J Food  
1498 Microbiol 2001;67(1-2):81-8.  
1499
- 1500 126. Haynes K. Virulence in *Candida* species. Trends Microbiol 2001;9(12):591-6.  
1501
- 1502 127. Hohl TM, Rivera A, Pamer EG. Immunity to fungi. Curr Opin Immunol  
1503 2006;18(4):465-72.  
1504
- 1505 128. Brusick DJ. Genetic risk assessment. JAPCA 1987;37(7):795.  
1506
- 1507 129. Ribeiro LR, Salvadori DMF, Marques EK, Mutagênese ambiental. Canoas -RS:  
1508 ULBRA Editora. 2003.  
1509
- 1510 130. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).  
1511 Resolução - RE n. 90. Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica  
1512 de fitoterápicos. Brasília-DF. 2004. Disponível em:[http://www.diariodasleis.com.br](http://www.diariodasleis.com.br/busca/exibmlink.php?numlink)  
1513 /busca/exibmlink.php?numlink. Acesso em 01/02/2015.  
1514
- 1515 131. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). Chemicals,  
1516 Guideline 425: Acute Oral Toxicity – Up-and-Down-Procedure (UPD) Paris. 2008.  
1517
- 1518 132. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).  
1519 DOU de 8 de agosto de 1996. Dispõe sobre normas para estudo da toxicidade de  
1520 produtos fitoterápicos. 1996.  
1521
- 1522 133. Oliveira RJ. Mecanismos de ação e efeito protetor de danos no DNA do  
1523 polissacarídeo  $\beta$ -glucana em testes *in vitro* e *in vivo*. Dissertação de Mestrado.  
1524 Londrina -PR: Universidade Estadual de Londrina. 2006.  
1525
- 1526 134. Hozier J, Applegate M, Moore MM. *In vitro* mammalian mutagenesis as a model  
1527 for genetic lesions in human cancer. Mutat Res 1992;270(2):201-9.  
1528
- 1529 135. Ferrari I. Teste do micronúcleo em cultura temporária de linfócitos. In: Rabelló-  
1530 Gay MN, Rodrigues M, Monteleone-Neto R. Mutagênese, Teratogênese e Carcino-  
1531 gênese: métodos e critérios de avaliação. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de  
1532 Genética/ Revista Brasileira 1991:107-112.  
1533
- 1534 136. Hayashi M, Morita T, Kodama Y, Sofuni T, Ishidate M. The micronucleus assay  
1535 with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides.  
1536 Mutat Res 1990;245(4):245-9.  
1537
- 1538 137. Navarro SD, Beatriz A, Meza A, *et al.* A new synthetic resorcinolic lipid 3-heptyl-  
1539 3,4,6-trimethoxy-3H-isobenzofuran-1-one: evaluation of toxicology and ability to

- 1540 potentiate the mutagenic and apoptotic effects of cyclophosphamide. Eur J Med  
1541 Chem 2014;75:132-42.  
1542
- 1543 138. Klaude M, Eriksson S, Nygren J, Ahnström G. The comet assay: mechanisms and  
1544 technical considerations. Mutat Res 1996;363(2):89-96.  
1545
- 1546 139. Olive PL, Wlodek D, Durand RE, Banáth JP. Factors influencing DNA migration  
1547 from individual cells subjected to gel electrophoresis. Exp Cell Res  
1548 1992;198(2):259-67.  
1549
- 1550 140. Speit G, Hanelt S, Helbig R, Seidel A, Hartmann A. Detection of DNA effects in  
1551 human cells with the comet assay and their relevance for mutagenesis. Toxicol Lett  
1552 1996;88(1-3):91-8.  
1553
- 1554 141. Laboratório de Genética Toxicológica (GENTOX). Manual de  
1555 Procedimentos:análise. Disponível em <http://gentox.bio.br/?page id=3>>. Acessado  
1556 em 28/11/2014.  
1557
- 1558 142. Krishna G, Hayashi M. *In vivo* rodent micronucleus assay: protocol, conduct and  
1559 data interpretation. Mutat Res 2000;455(1-2):155-66.  
1560
- 1561 143. Schmid W. The micronucleus test. Mutat Res 1975;31(1):9-15.  
1562
- 1563 144. Almeida MR. Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade, antigenotoxicidade e  
1564 expressão dos genes Tp53 e Ephx2 em ratos tratados com caryocar villosus.  
1565 Dissertação de Mestrado. Ribeirão Preto-SP.Universidade de São Paulo.2012.  
1566
- 1567 145. Grivicich I, Regner A, Rocha AB. Morte celular por apoptose. Revista Brasileira de  
1568 Cancerologia 2007;53(3):335-43.  
1569
- 1570 146. Plenchette S, Filomenko R, Logette E, et al. Analyzing markers of apoptosis *in*  
1571 *vitro*. Methods Mol Biol 2004;281:313-31.  
1572
- 1573 147. Cheila ECF. Autofagia. Centro de Biotecnologia. Instituto de Biociência  
1574 (IB).Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Disponível em:  
1575 <http://www.ufrgs.br/labsinal/autofagia.htm>. Acessado em 20/06/2015.  
1576
- 1577 148. Kwiatkowska K, Sobota A. Signaling pathways in phagocytosis. Bioessays  
1578 1999;21(5):422-31.  
1579
- 1580 149. Ramadan S, Baltzer PA, Lin A, et al. L-COSY of breast cancer at 3T. Eur J Radiol  
1581 2012;81:129-31.  
1582
- 1583 150. Boatright KM, Salvesen GS. Mechanisms of caspase activation. Curr Opin Cell  
1584 Biol 2003;15(6):725-31.  
1585
- 1586
- 1587

1588 **5. ANEXOS**

1589

1590 **5.1 Artigo Científico 1**

1591

1592 *Arthritis Research & Therapy*

1593

1594

1595 **Efeito anti-hiperuricêmico do extrato etanólico das folhas da *Echinodorus macro-***  
1596 ***phyllus*, em ratos hiperuricêmicos induzido por ácido oxônico**

1597

1598 Márcia Soares Mattos Vaz<sup>1</sup>, Mário Sergio Vaz da Silva<sup>1</sup>, Jonas da Silva Mota<sup>2</sup>, Jeffer-  
1599 son Rodrigues<sup>1</sup>, Débora Regina Hoff Brait<sup>1</sup>, Ramão Souza de Deus Junior<sup>1</sup>, Marcio E-  
1600 duardo de Barros<sup>1,3</sup>

1601

1602 <sup>1</sup>Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Grande Dourados - Dou-  
1603 rados, Mato Grosso do Sul, Brasil.1604 <sup>2</sup>Centro de Pesquisas em Biodiversidade (CPBIO) Universidade Estadual do Mato  
1605 Grosso do Sul (UEMS) - Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil1606 <sup>3</sup>Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados – Dourados, Mato  
1607 Grosso do Sul.

1608

1609 \*Corresponding author.

1610 Marcio Eduardo De Barros

1611 Faculdade de Ciências da Saúde

1612 Rodovia Dourados – Ithau, Km 12, Cidade Universitária

1613 Dourados – MS

1614 CEP: 79800-000

1615 (marciobarros@ufgd.edu.br)

1616

1617

1618 **ABSTRACT**

1619

1620 **Introduction:** *Echinodorus macrophyllus* popularly known as “chapéu de couro” in  
1621 Brazil and has been used by folk medicine to treat hyperuricemia, rheumatoid arthritis,  
1622 renal diseases and others. This study aimed to investigate the effect of extract obtained  
1623 from *E. macrophyllus* leaves in hyperuricemic rats induced by oxonic acid and analyze  
1624 histopathological alterations in kidney and bladder. **Methods:** The extract of *E.*  
1625 *macrophyllus* were analyzed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC).  
1626 Oxonic acid-induced hyperuricemic male *Wistar* rats were orally treated with *E.*  
1627 *macrophyllus* extract at doses of 125 or 250 mg/kg for 7 days. Serum and urinary levels  
1628 of uric acid, creatinine, blood urea nitrogen (BUN), fractional excretion of uric acid  
1629 (FEUA) and histopathology of kidney and bladder were analyzed. **Results:** HPLC anal-  
1630 ysis of *E. macrophyllus* extract showed the presence of flavonoids of type Flavonol.  
1631 Treatments with *E. macrophyllus* decreased serum levels of uric acid, increased renal  
1632 elimination and FEUA, without alterations in renal and bladder histopathology when  
1633 comparing to the negative control group. **Conclusion:** Decreased serum levels of uric  
1634 acid and increased elimination of uric acid and FEUA showed that *E. macrophyllus* ex-  
1635 tract has antihyperuricemic activity, corroborating to the use of traditional medicine.



1636  
1637 **Keywords:** *Echinodorus macrophyllus*, hyperuricemia, uric acid, flavonoids, oxonic  
1638 acid.  
1639

1640  
1641 **INTRODUÇÃO**

1642  
1643 A *Echinodorus macrophyllus* (Kunt) Micheli (Família Alismataceae), popularmente  
1644 conhecida como "Chapéu-de-Couro", é uma planta medicinal que cresce abundantemen-  
1645 te no Brasil, sendo utilizadas na medicina popular como adstringente, diurética, antiar-  
1646 rítmica, na artrite reumatóide, aterosclerose, infecções de pele, doenças respiratórias,  
1647 hepáticas, do trato urinário (litíase e nefrolitíase) [1,2] e diminuição do ácido úrico séri-  
1648 co (AUs) [3].

1649 O ácido úrico (AU) é produzido principalmente no fígado, um produto final do metabo-  
1650 lismo das purinas, adenina e guanina. O aumento da sua concentração no sangue, acima  
1651 dos valores de referência, leva a hiperuricemia (HU) [4], o que corresponde a uma pre-  
1652 valência de 5 a 8% da população masculina nos Estados Unidos [5], atuando como o  
1653 principal fator de risco para o desenvolvimento da gota [6], sendo que nessa nos países  
1654 ocidentais, afeta cerca de 1-2% dos adultos, com uma prevalência aumentada com a  
1655 idade, sendo 7% em homens com mais de 65 anos e 3% em mulheres acima de 85 anos  
1656 [7], sendo que a HU é associada também à disfunção renal, doença cardiovascular, hi-  
1657 pertensão, diabetes [8] e síndrome metabólica [9].

1658 Os medicamentos atualmente mais utilizados na prática clínica para a HU são os  
1659 inibidores da xantina oxidase (XO) e os agentes uricosúricos (probenecide e  
1660 benzobromarona). O alopurinol, inibidor da XO, é amplamente prescrito para  
1661 tratamento da HU e gota, mas a síndrome de hipersensibilidade ao alopurinol continua a  
1662 ser um perigo grave e potencialmente letal, que pode se desenvolver dentro dos três  
1663 primeiros meses de introdução do alopurinol. Efeitos tóxicos graves induzidos por

1664 alopurinol atingem < 1 % dos pacientes, mas pode ser fatal, com uma taxa de  
1665 mortalidade de cerca de 20 % [10,11].

1666 As drogas uricosúricas estão associadas com um risco elevado de urolitíase, além disso,  
1667 a ingestão de líquidos deve ser aumentada e o pH da urina mantido acima de 6,0 para  
1668 impedir o desenvolvimento de cálculos renais [12].O probenecide é geralmente ineficaz  
1669 em doentes com insuficiência renal concomitante, e a benzobromarona é eficaz em  
1670 pacientes com insuficiência renal moderada, mas possui um risco de hepatotoxicidade  
1671 grave [13].

1672 Há alguns anos, muitos inibidores da XO tem sido isolados e caracterizados a partir de  
1673 plantas medicinais, sendo alternativas viáveis no tratamento da HU [14].

1674 Estudos com *Echinodorus macrophyllus* (*E. macrophyllus*) tem demonstrados efeitos  
1675 imunossupressores [15], anti-inflamatórias [16] e nefropotetoras [17], mas até o  
1676 momento estudos experimentais em relação a sua atividade na HU não foram realizadas.  
1677 Nesse, sentido o objetivo do estudo é confirmar cientificamente o uso empírico da *E.*  
1678 *macrophyllus* na HU, em modelos experimentais induzido pelo ácido oxônico (AO),  
1679 assim como avaliar os rins e bexiga após a administração da *E. macrophyllus*,  
1680 contribuindo para a utilização da espécie na medicina tradicional e subsidiar outros  
1681 testes de atividade farmacológica.

1682

## 1683 **MÉTODOS**

1684

### 1685 **Material botânico**

1686 As folhas da *E. macrophyllus* foram coletadas na região de Dourados, Mato Grosso do  
1687 Sul, Brasil (latitude 22° 14'S e longitude 54° 45'W e 452 m de altitude) na primeira  
1688 quinzena de abril de 2014. A espécie foi identificada pela professora Dr.<sup>a</sup> Zefa

1689 Valdevina Pereira na Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais (FCBA) da  
1690 Universidade Federal da Grande Dourados/ Dourados/MS, sendo a exsicata depositada  
1691 sob o número 2085.

1692

#### 1693 **Preparação do Extrato Bruto da *Echinodorus macrophyllus***

1694 As folhas da *E. macrophyllus* foram secas à temperatura ambiente e posteriormente pul-  
1695 verizadas com auxílio de um moinho de facas, sendo obtido cerca de 500 g do material  
1696 pulverizado que foi submetido a três extrações por maceração com etanol (92,8%), cada  
1697 uma utilizando 2 L de solvente. As soluções resultantes foram concentradas em evapo-  
1698 rador rotativo. Sendo obtidos 55 g de extrato etanólico da *E. macrophyllus*, tendo um  
1699 rendimento de 9,09 %.

1700

#### 1701 **Análise do Extrato Bruto por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

1702 Foi usado o Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE) modelo: SHIMADZU  
1703 LC6A, detector de arranjo de diodos (DAD), com varredura entre 200-800 nm. Coluna  
1704 Phenomenex C-18 (4,6 mm x 250 mm, diâmetro da partícula 10 µm) e pré-coluna (25  
1705 mm x 3 mm) de mesma fase da coluna. A eluição foi realizada em sistema gradiente:  
1706 MeOH/H<sub>2</sub>O de 5 a 100% metanol, levando 15 minutos para atingir 100 % de metanol,  
1707 permanecendo 5 minutos a 100% de metanol e 5 minutos para retornar as condições  
1708 iniciais. O tempo de análise total foi de 25 minutos, a vazão de fluxo da bomba de 1  
1709 mL/min, volume injetado 5 µL. As amostras foram filtradas com um micro-filtro de  
1710 0,20 µm.

1711

#### 1712 **Reagentes e Drogas**

1713 Alopurinol, AO e benzobromarona foram adquiridos da Sigma-Aldrich® Co. LLC (St.  
1714 Louis, MO, USA). Os kits para as análises do AU, creatinina, uréia, colesterol total,

1715 triglicéridos, alanina transaminase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) foram  
1716 obtidos da Gold Analisa Diagnóstica LTDA, Belo Horizonte MG, Brasil.

1717

### 1718 **Animais**

1719 Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*, variedade *Wistar*) machos (n=30), de 8 a 12  
1720 semanas, com peso inicial entre 200 a 280 g, fornecido pelo Biotério da Universidade  
1721 Federal da Grande Dourados (UFGD). Os animais foram mantidos em gaiolas de poli-  
1722 propileno, com temperatura ( $22 \pm 3^\circ \text{C}$ ), umidade (40-60%) e luminosidade (ciclo claro-  
1723 escuro de 12h) controladas, recebendo ração comercial padrão e água *ad libitum*. A pes-  
1724 quisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal  
1725 da Grande Dourados, sob Protocolo nº. **015/2014**, e todos os procedimentos realizados  
1726 foram de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação  
1727 Animal (CONCEA) [18].

1728

### 1729 **Modelo hiperuricêmico experimental e administração das drogas**

1730 Os ratos (machos) foram divididos e randomizados em seis grupos compostos por cinco  
1731 ratos. O modelo hiperuricêmico em ratos foi induzido pelo AO 250 mg/kg (inibidor da  
1732 uricase) para o estudo da ação das drogas [19,20]. O tratamento da *E. macrophyllus* foi  
1733 realizado nas doses de 125 e 250 mg/kg (grupos: EEM125 e EEM250 mg/kg), e os gru-  
1734 pos controles positivos foram com alopurinol 10 mg/kg (inibidor da XO) e benzobroma-  
1735 rona 10 mg/kg (uricosúrico), os quais foram dissolvidos em solução fisiológica 0,9% e  
1736 administrados via gavagem. O AO 250 mg/kg foi administrado durante sete dias  
1737 consecutivos, e após o extrato de *E. macrophyllus*, o alopurinol (AL) e benzobromarona  
1738 (BENZ) foram iniciados no oitavo dia, 1h após a administração do AO até o décimo  
1739 quarto dia. No grupo controle negativo, foi administrado apenas solução fisiológica.

1740

1741 **Coleta de sangue, urina e amostras de tecido**

1742 Amostras de sangue foram coletadas na veia da cauda do animal, para dosagens bio-  
 1743 químicas séricas. A fração de excreção de AU (FEUA) foi calculada utilizando a  
 1744 seguinte fórmula [21]:

$$FEUA = \frac{AUu \times CREs}{CREu \times AU_s} \times 100$$

Onde se lê AUu = Acido urico urinário ; CREs = creatinina sérica ; CREu =  
 creatinina urinária ; AU<sub>s</sub> = ácido úrico sérico

1745

1746 Após a coleta sanguínea os animais foram colocados em gaiolas metabólicas individuais  
 1747 para a coleta de urina de 24h.

1748 Após o período de tratamento e coleta de sangue, foi realizado o procedimento de euta-  
 1749 násia dos animais de acordo com as Diretrizes de Eutanásia do Conselho Nacional do  
 1750 Controle de Experimentação Animal (CONCEA) [18]. O baço, bexiga, coração, fígado,  
 1751 pulmão, rim esquerdo e rim direito foram pesados e avaliados macroscopicamente.  
 1752 Somente os rins e bexiga foram fixados em formalina, embebidos em parafina e secções  
 1753 de 3-5 µm foram cortadas em micrótomo rotativo e coradas com hematoxilina-eosina  
 1754 (HE), para a avaliação histopatológica sendo observadas ao microscópio óptico com  
 1755 uma ampliação de 200 vezes.

1756

1757 **Análise Estatística**

1758 A estatística descritiva foi apresentada por médias e desvio padrão. Para a verificação da  
 1759 normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias foi usado PROC  
 1760 UNIVARIATE. Os dados paramétricos foram analisados pelo teste TUKEY ajustado de  
 1761 PROC MIXED. Foi adotado um nível de significância de 5%. Os dados foram analisa-  
 1762 dos pelo programa SAS (versão 9.1.3, SAS Institute, Cary, NC 2004).

1763

**RESULTADOS**

1764 **Análise dos extratos via Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).**

1765 Na análise da CLAE (254,4 nm), o EEM demonstrou compostos característicos de fla-  
1766 vonóides (Figura 1A), os espectros na região ultravioleta dos compostos com tempo de  
1767 retenção em 11,63 e 11,98 minutos (1B e 1C), são espectros de flavonóides do tipo fla-  
1768 vonol.

1769

1770 **Efeito anti-hiperuricêmicos da *Echinodorus macrophyllus* em ratos**

1771 Na análise do AUs, na comparação intragrupos entre o momento da indução do modelo  
1772 comparado com o momento após o tratamento, os grupos ALO, BENZ e EEM250 apre-  
1773 sentaram redução significativa ( $p \leq 0,001$ ) das médias (figura 2A). Quando comparamos  
1774 após o tratamento entre os grupos (figura 3A) o ALO ( $p \leq 0,001$ ) e EEM250 ( $p \leq 0,01$ )  
1775 demonstraram diferença com relação ao grupo controle. O grupo ALO também foi dife-  
1776 rente em relação aos grupos EEM250 ( $p \leq 0,001$ ) e BENZ ( $p \leq 0,001$ ). O grupo EEM250  
1777 demonstrou reduzir o AUs em ratos hiperuricêmicos com efeitos semelhantes com as  
1778 drogas de referências alopurinol e benzobromarona.

1779 Com relação aos estudos do AUu, a comparação intragrupo entre os momentos indução  
1780 e tratamento demonstrou que os grupos BENZ e EEM250 apresentaram aumento signi-  
1781 ficante ( $p \leq 0,001$ ) na excreção do AUu (figura 2B). Ao comparar as médias dos grupos  
1782 após o tratamento (figura 3B), os grupos BENZ ( $p \leq 0,01$ ) e o grupo EEM250 ( $p \leq 0,05$ )  
1783 foram diferentes do grupo controle. O grupo EEM250 demonstrou diferença estatística  
1784 em comparação ao grupo BENZ ( $p \leq 0,01$ ) e ALO ( $p < 0,01$ ). E o grupo BENZ foi dife-  
1785 rente do grupo ALO ( $p \leq 0,01$ ). Neste sentido, a BENZ apresentou maior excreção de AU  
1786 na urina, seguida pelo grupo EEM250.

1787 As médias da FEUA na análise intragrupo entre os momentos indução e tratamento de-  
1788 monstraram diferenças ( $p \leq 0,001$ ) nos grupos ALO, BENZ e EEM250 (figura 2C), com-

1789 parados ao início do protocolo. Após o tratamento na comparação entre os grupos (figu-  
1790 ra 3C) demonstraram diferenças estatísticas nos grupos ALO ( $p \leq 0,05$ ), EEM250  
1791 ( $p \leq 0,05$ ) e BENZ ( $p \leq 0,01$ ) em relação ao grupo controle. O grupo EEM250 foi diferen-  
1792 te estatisticamente, também, do grupo ALO ( $p \leq 0,05$ ), assim como o grupo BENZ como  
1793 do grupo ALO ( $P \leq 0,05$ ). Neste sentido, observou-se que EEM250 apresentou elimina-  
1794 ção da FEUA, semelhante à droga BENZ no aumento da porcentagem da FEUA.

1795 Em relação aos níveis de CREs e BUN, após o tratamento com o extrato de *E.*  
1796 *macrophyllus* não apresentaram elevações significativa no soro e na urina comparados  
1797 ao controle negativo, permanecendo com valores dentro da normalidade em todos os  
1798 grupos (valores não apresentados).

1799 Os volumes urinários apresentados foram maiores nos grupos BENZ, AL, EEM125 e  
1800 EEM250 ( $p < 0,001$ ), respectivamente em relação ao grupo controle negativo (Tabela  
1801 1). O peso corporal de todos os ratos aumentou gradualmente ao longo de todo o expe-  
1802 rimento, independentemente do seu grupo de tratamento, não sendo influenciada pela  
1803 administração aguda de todas as substâncias (Tabela 1).

1804 O AO promoveu um aumento dos valores de colesterol total nos grupos administrados,  
1805 entretanto o tratamento com as respectivas substâncias não foram capazes de reduzir  
1806 esses parâmetros bioquímicos (Tabela 1), sendo diferentes estatisticamente em relação  
1807 ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). Enquanto os valores de triglicerídeos dos grupos BENZ,  
1808 EEM125 e EEM250 foram diferentes do grupo controle ( $p < 0,011$ ). A AST não apresen-  
1809 tou diferença entre os grupos, já em relação aos níveis séricos da ALT, houve diminui-  
1810 ção dos valores na presença do EEM125 e EEM250 (Tabela 1).

1811

1812 **Avaliação Histológica**

1813 Nas análises macroscópicas, os órgãos não apresentaram alterações visíveis. Em relação  
1814 ao peso relativo do tamanho dos órgãos no grupo AO a bexiga teve o seu peso aumen-  
1815 tado comparado com os outros grupos tratados com as respectivas substâncias. Quanto à  
1816 análise histológica, não foram observadas alterações nas estruturas microscópicas, nos  
1817 rins e na bexiga.

1818

## 1819 **DISCUSSÃO**

1820 Os flavonóides são amplamente encontrados em frutos e vegetais e possuem atividades  
1821 farmacológicas, pois além da possibilidade de inibir a XO, tem ação antioxidante, anti-  
1822 bacteriana e atividades antivirais [22]. Os resultados da CLAE identificaram compostos  
1823 espectros de Ultra Violeta (UV) característico de flavonóides, corroborando com as  
1824 análises dos padrões referenciados por Dourado [23], onde a identificação de  
1825 flavonóides mostraram espectros de UV similares ao encontrado na nossa análise. No  
1826 estudo de Cosenza [24], foram identificados dois flavonóides no extrato da *E.*  
1827 *macrophyllus*, sendo a isovitexina e vitexina, confirmando a presença de flavonóides na  
1828 espécie estudada neste trabalho, e a vitexina é considerado marcador químico dessa  
1829 espécie. Além disso, a vitexina e a isovitexina apresentam várias atividades  
1830 farmacológicas tais como anti-hipertensiva, anti-inflamatória, antiespasmódica [25],  
1831 antimicrobiana [26], antioxidante [27] e efeitos radioprotetores [28]. E recentemente,  
1832 evidências demonstraram que a vitexina pode proteger a hipertrofia cardíaca [29], a  
1833 agregação plaquetária e contratilidade do músculo liso vascular [30].

1834 As substâncias com atividades hipouricemiantes, que possam auxiliar, ou até mesmo,  
1835 substituir o tratamento convencional da HU tem sido pesquisadas em várias partes do  
1836 mundo, com o foco, principalmente, nas plantas medicinais. E os compostos de flavo-  
1837 nóides têm demonstrado capacidades de inibição da atividade da XO, diminuindo assim



1838 os níveis AUs [31]. Nos estudos de Shi *et al* [32], Tung *et al* [33] e Ahmad *et al* [34]  
1839 com extrato etanólico da *Ramulus mori e Acacia confusa* com a fração acetato de etila  
1840 da *Pistacia integerrima*, respectivamente, todos avaliando a redução dos níveis de urato,  
1841 observaram em suas folhas a presença de flavonóides, os quais apresentaram atividade  
1842 hipouricemiante em ratos com HU, corroborando com os nossos dados, onde o EEM250  
1843 reduziu, também, de forma significativa os níveis de AUs em ratos hiperuricêmicos, ne-  
1844 cessitando de outros estudos relacionados aos flavonóides presentes no extrato de *E.*  
1845 *macrophyllus* para confirmar a sua ação na XO.

1846 A HU está relacionada à diminuição da excreção do AU em 90% dos casos [35] e não  
1847 devido a sua maior produção, além disso, a maioria dos pacientes com gota tem  
1848 excreção renal de AU prejudicada [36], porém a droga de referência para o tratamento  
1849 da HU é uma inibidora da XO (alopurinol), mesmo com os seus efeitos colaterais, em  
1850 relação aos agentes uricosúricos (benzobromarona) que podem causar hepatotoxicidade  
1851 [37].

1852 Na fase intercrítica associada a droga hipouricemiante (alopurinol), entre as crises agu-  
1853 das da gota, o tratamento utilizado para evitar novas crises, tem sido a colchicina na  
1854 forma de profilaxia. Entretanto, os pacientes com intolerância a essa droga, a alternativa  
1855 utilizada são doses pequenas de um anti-inflamatório não esteróides, como naproxeno  
1856 ou indometacina [38]. O extrato da *E. macrophyllus* apresenta atividade anti-  
1857 inflamatória [16] e no nosso experimento, o extrato de *E. macrophyllus* na dosagem 250  
1858 mg/kg apresentou de forma significativa, redução do AUs com aumento do AUu e con-  
1859 sequentemente da FEUA, com efeitos semelhantes das drogas de referências, o alopuri-  
1860 nol (inibidor da XO) e benzobromarona (hiperuricosúrico), sendo eficiente na redução  
1861 dos níveis de AUs. Este resultado é semelhante ao estudo de Wang *et al* [39] onde  
1862 observaram o aumento da excreção de uratos decorrente da ação do flavonóide morin,

1863 diminuindo os níveis de AUs. E o aumento do FEUA é um parâmetro importante, pois  
1864 indica não somente a remoção do urato monossódico depositado em tecidos renais, mas  
1865 também previne o crescimento e/ou agregação destes cristais [40], dado importante en-  
1866 contrado no presente estudo, haja vista, a existência da associação entre HU e disfunção  
1867 renal, independente da formação de cristais de urato [12]. Neste sentido, o extrato de *E.*  
1868 *macrophyllus*, na dosagem de 250 mg/kg reduz a hiperuricemia com aumento da  
1869 eliminação do AU em nível renal evidenciado nesse estudo e possui ação anti-  
1870 inflamatória evidenciado no estudo de Rangel *et al* [16] com perspectiva de poder ser  
1871 utilizada como hipouricemiante, além de como anti-inflamatorio podendo evitar novas  
1872 crises, demonstrando uma ação completa, com apenas um único produto no tratamento  
1873 profilático para que não ocorra novas crises de gota.

1874 Os valores da creatinina e de BUN no sangue são indicadores úteis da avaliação de alte-  
1875 rações da função renal [41]. Nos nossos resultados não ocorreram diferenças significan-  
1876 tes na CREs e BUN nos grupos tratados com o extrato de *E. macrophyllus*, onde os va-  
1877 lores permaneceram dentro da faixa de normalidade, não apresentando alteração clínica,  
1878 resultados estes semelhantes aos demonstrados no estudo de Huang *et al* [42],  
1879 importante resultado já que vários estudos prospectivos têm relatado que HU é acompa-  
1880 nhada de doença renal crônica, incluindo hipertrofia glomerular e disfunção endotelial  
1881 [43].

1882 Além disso, Portella *et al* [17] avaliaram a nefrotoxicidade e danos nos túbulos renais  
1883 acarretados pelo antibiótico gentamicina em ratos, e observaram que a administração o  
1884 extrato de *E. macrophyllus* foi capaz de reverter essas alterações.

1885 O uso de plantas para fins de cura está cada vez mais popular por se acreditar que elas  
1886 possuem apenas ações benéficas e são livres de efeitos colaterais [44]. No entanto, o uso  
1887 milenar de plantas medicinais mostrou, ao longo dos anos, que determinadas plantas

1888 apresentam substâncias potencialmente perigosas. Do ponto de vista científico, pesqui-  
1889 sas mostraram que muitas delas possuem substâncias potencialmente agressivas e, por  
1890 esta razão, devem ser utilizadas com cuidado, respeitando seus riscos toxicológicos  
1891 [45].

1892 A administração da EEM, nas doses de 125 e 250 mg/kg, não apresentaram alteração  
1893 hepática, avaliadas a partir das enzimas hepáticas AST e ALT, sendo que nos grupos da  
1894 EEM a ALT (enzima que se encontra com maior porcentagem no fígado) ficou com  
1895 valores menores que o controle negativo, mostrando que a função do fígado permanece  
1896 normal após o tratamento com o extrato de *E. macrophyllus*, durante 7 dias em ratos  
1897 hiperuricêmicos ,bem como também não mostraram nenhuma alteração em nível histo-  
1898 lógico nos rins e bexiga. Com isso, o extrato de *E. macrophyllus* apresenta-se como  
1899 opção terapêutica importante no tratamento da HU, visto que, as drogas de referência  
1900 utilizadas no tratamento convencional, apresenta-se com vários efeitos colaterais, sendo  
1901 o alopurinol associado a reações de hipersensibilidade fatais, incluindo erupção cutânea  
1902 medicamentosa com eosinofilia e sintomas sistêmicos, síndrome de Stevens-Johnson  
1903 (forma grave, às vezes fatal, do eritema multiforme ou polimorfo, que acomete o tegu-  
1904 mento e as mucosas oral, genital, anal e ocular) e necrólise epidérmica tóxica e a benzo-  
1905 bromarona com hepatotoxicidade, [37,46].

1906 Os resultados desse estudo fornecem evidências da atividades anti-hiperuricemiante da  
1907 *E. macrophyllus*, com eliminação do AUu, sugerindo a necessidade de maiores estudos  
1908 sobre as possíveis substâncias que tenham este efeito, dentre elas principalmente, os  
1909 flavonóides. Portanto, este estudo vem corroborar com o conhecimento popular dos  
1910 efeitos do o extrato de *E. macrophyllus* (chapéu de couro) no tratamento da HU.

1911  
1912  
1913  
1914

1915  
1916

## CONCLUSÃO

1917 Conclui-se que o extrato de *E. macrophyllus* possui flavonóides com padrões do tipo  
1918 flavonol, e possui atividade anti-hiperuricemiante, com diminuição nos níveis de ácido  
1919 úrico sérico demonstrado pelo aumento na excreção de uratos e valor aumentado de  
1920 FEUA em ratos hiperuricêmicos.

1921

## AGRADECIMENTOS

1923 Os autores agradecem o apoio financeiro realizado pelas Instituições:

- 1924 • Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior  
1925 (CAPES);
- 1926 • Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tec-  
1927 nologia do Estado do Mato Grosso do Sul (FUNDECT) - CNPq No.  
1928 05/2011 - PPP;
- 1929 • Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Doura-  
1930 dos.
- 1931 • A professora Dr.<sup>a</sup> Zefa Valdivina Pereira lotada na Faculdade de  
1932 Ciências Biológicas e Ambientais (FCBA) da Universidade Federal  
1933 da Grande Dourados/ Dourados/MS pela identificação da planta  
1934 *Echinodorus macrophyllus*;
- 1935 • Ao Laboratório de Pesquisa de Ciências da Saúde (LPCS) da Uni-  
1936 versidade Federal da Grande Dourados pelo fornecimento dos mi-  
1937 cro-organismos utilizados nos testes antibacterianos.

1938 Declaração de divulgação: Os autores declaram não haver conflito de interesses

1939

1940

1941 **REFERÊNCIAS**

- 1942 Leite JPV, Pimenta DS, Gomes RSDL, Dantas-Barros AM. Contribuição ao estudo  
1943 farmacobotânico da *Echinodorus macrophyllus* (Kunth) Micheli (chapéu-de-couro) -  
1944 Alismataceae. In; Brazilian Journal of Pharmacognosy 2007;17(2): 242-48.  
1945
- 1946 Buznego MT, Pérez-Saad H. Behavioral and antiepileptic effect of acute administration  
1947 of the extract of the aquatic plant *Echinodorus berteroi* (Sprengel) Fassett (upright  
1948 burhead). Epilepsy Behav 2006;9(1):40-5.  
1949
- 1950 Coimbra R 1994. Manual de fitoterapia. Belém: CEJUP.  
1951
- 1952 Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell RN. Sistema musculoesquelético. In: Patologia  
1953 básica. São Paulo-SP. 8a ed. Elsevier 2008. p896.  
1954
- 1955 McLean M & Becker MA. Etiology and pathogenesis of gout. In Hochberg MC, Silman  
1956 AJ, Smolen JS, Weinblatt ME, Weisman MH. Rheumatology. 5ª ed. Philadelphia –  
1957 EUA Mosby Elsevier 2014. p. 1841-57.  
1958
- 1959 Singh JA, Reddy SG, Kundukulam J. Risk factors for gout and prevention: a systematic  
1960 review of the literature. Curr Opin Rheumatol 2011;23(2):192-202.  
1961
- 1962 Roddy E, Doherty M. Epidemiology of gout. Arthritis Res Ther 2010;12(6):223.  
1963 Zhu Y, Pandya BJ, Choi HK. Comorbidities of gout and hyperuricemia in the US  
1964 general population: NHANES 2007-2008. Am J Med 2012;125(7):679-87.  
1965
- 1966 Rho YH, Choi SJ, Lee YH, Ji JD, Choi KM, Baik SH, *et al.* The prevalence of  
1967 metabolic syndrome in patients with gout: a multicenter study. J Korean Med Sci  
1968 2005;20(6):1029-33.  
1969
- 1970 Gutiérrez-Macías A, Lizarralde-Palacios E, Martínez-Odrizola P, Miguel-De la Villa  
1971 F. Fatal allopurinol hypersensitivity syndrome after treatment of asymptomatic  
1972 hyperuricaemia. BMJ 2005;331(7517):623-4.  
1973
- 1974 Bardin T, Richette P. Definition of hyperuricemia and gouty conditions. Curr Opin  
1975 Rheumatol 2014;26(2):186-91.  
1976
- 1977 Richette P, Bardin T. Gout. Lancet 2010;375(9711):318-28.  
1978
- 1979 Perez-Ruiz F, Alonso-Ruiz A, Calabozo M, Herrero-Beites A, García-Erauskin, G, Ruiz  
1980 -Lucea E. Efficacy of allopurinol and benzbromarone for the control of hyperuricaemia.  
1981 A pathogenic approach to the treatment of primary chronic gout. Ann Rheum Dis  
1982 1998;57(9):545-9.  
1983
- 1984 Albuquerque UP, Hanazaki N. As pesquisas etnoguiadas na descoberta de novos  
1985 fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. Revista  
1986 Brasileira de Farmacognosia 2006;16:678-89.  
1987

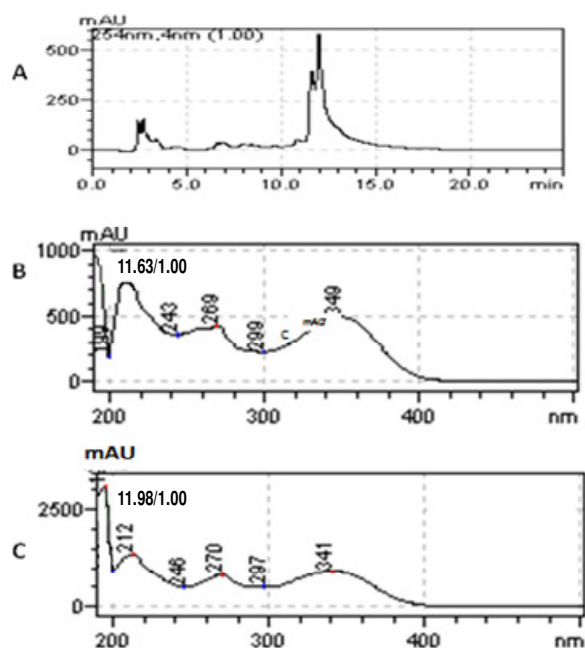
- 1988 Pinto AC, Rego GC, Siqueira AM, Cardoso CC, Reis PA, Marques EA *et al.*  
 1989 Immunosuppressive effects of *Echinodorus macrophyllus* aqueous extract. J  
 1990 Ethnopharmacol 2007;111(2):435-9.  
 1991
- 1962 Tanus-Rangel E, Santos SR, Lima JC, Lopes L, Noldin V, Monache FD *et al.* Topical  
 1993 and systemic anti-inflammatory effects of *Echinodorus macrophyllus* (Kunth) Micheli  
 1994 (Alismataceae). J Med Food 2010;13(5):1161-6.  
 1995
- 1976 Portella VG, Cosenza GP, Diniz LR, Pacheco LF, Cassali GD, Caliarri MV *et al.*  
 1997 Nephroprotective Effect of *Echinodorus macrophyllus* Micheli on Gentamicin-Induced  
 1998 Nephrotoxicity in Rats. Nephron Extra 2012;2(1):177-83.  
 1999
- 2080 Brasil. Ministério Nacional de Ciência & Tecnologia. Diretrizes da Prática de Eutanásia  
 2001 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA 2013.  
 2002
- 2003 Li JM, Zhang X, Wang X, Xie YC, Kong LD. Protective effects of cortex fraxini  
 2004 coumarines against oxonate-induced hyperuricemia and renal dysfunction in mice. Eur J  
 2005 Pharmacol 2011;666(1-3):196-204.  
 2006
- 2007 Hua J, Huang P, Zhu CM, Yuan X, Yu CH. Anti-hyperuricemic and nephroprotective  
 2008 effects of Modified Simiao Decoction in hyperuricemic mice. J Ethnopharmacol  
 2009 2012;142(1):248-52.  
 2010
- 2011 Kong LD, Yang C, Ge F, Wang HD, Guo YS. A Chinese herbal medicine Ermiao wan  
 2012 reduces serum uric acid level and inhibits liver xanthine dehydrogenase and xanthine  
 2013 oxidase in mice. J Ethnopharmacol 2004;93(2-3):325-30.  
 2014
- 2015 Lin CM, Chen CS, Chen CT, Liang YC, Lin JK. Molecular modeling of flavonoids that  
 2016 inhibits xanthine oxidase. Biochem Biophys Res Commun 2002;294(1):167-72.  
 2017
- 2018 Dourado R, Sel ÂM. Identificação de flavonóides em *Hypericum cordatum* (Vell.) N.  
 2019 Robson (Clusiaceae). Revista Brasil Bot 2008;31,(4):611-620.  
 2020
- 2021 Cosenza GP. Efeito do extrato bruto das folhas de *Echinodorus macrophyllus* e de  
 2022 frações semipurificadas sobre a função renal em ratos com necrose tubular aguda  
 2023 induzida por gentamicina. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Minas  
 2024 Gerais. Belo Horizonte - MG; 2010.  
 2025
- 2016 Prabhakar MC, Bano H, Kumar I, Shamsi MA, Khan MS. Pharmacological  
 2027 investigations on vitexin. Planta Med 1981;43(4):396-403.  
 2028
- 2009 Agnese AM, Pérez C, Cabrera JL. Adesmia aegiceras: antimicrobial activity and  
 2030 chemical study. Phytomedicine 2001;8(5):389-94.  
 2031
- 2012 Picerno P, Mencherini T, Lauro MR, Barbato F, Aquino R. Phenolic constituents and  
 2033 antioxidant properties of *Xanthosoma violaceum* leaves. J Agric Food Chem  
 2034 2003;51(22):6423-8.  
 2035

- 2086 Bramati L, Aquilano F, Pietta P. Unfermented rooibos tea: quantitative characterization  
2037 of flavonoids by HPLC-UV and determination of the total antioxidant activity. J Agric  
2038 Food Chem 2003;51(25):7472-4.  
2039
- 2090 Lu CC, Xu YQ, Wu JC, Hang PZ, Wang Y, Wang C *et al.* Vitexin protects against  
2041 cardiac hypertrophy via inhibiting calcineurin and CaMKII signaling pathways. Naunyn  
2042 Schmiedebergs Arch Pharmacol 2013;386(8):747-55.  
2043
- 2004 Afifi FU, Abu-Dahab R. Phytochemical screening and biological activities of *Eminium*  
2045 *spiculatum* (Blume) Kuntze (family Araceae). Nat Prod Res 2012;26(9):878-82.  
2046
- 2047 Nagao A, Seki M, Kobayashi H. Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids. Biosci  
2048 Biotechnol Biochem 1999;63(10):1787-90.  
2049
- 2050 Shi YW, Wang CP, Wang X, Zhang YL, Liu L, Wang RW *et al.* Uricosuric and  
2051 nephroprotective properties of *Ramulus Mori* ethanol extract in hyperuricemic mice. J  
2052 Ethnopharmacol 2012;143(3):896-904.  
2053
- 2054 Tung YT, Hsu CA, Chen CS, Yang SC, Huang CC, Chang ST. Phytochemicals from  
2055 *Acacia confusa* heartwood extracts reduce serum uric acid levels in oxonate-induced  
2056 mice: their potential use as xanthine oxidase inhibitors. J Agric Food Chem  
2057 2010;58(18):9936-41.  
2058
- 2059 Ahmad NS, Farman M, Najmi MH, Mian KB, Hasan A. Pharmacological basis for use  
2060 of *Pistacia integerrima* leaves in hyperuricemia and gout. J Ethnopharmacol  
2061 2008;117(3):478-82.  
2062
- 2063 Choi HK, Mount DB, Reginato AM, Physicians ACo, Society AP. Pathogenesis of  
2064 gout. Ann Intern Med 2005;143(7):499-516.  
2065
- 2066 Perez-Ruiz F, Calabozo M, Erauskin GG, Ruibal A, Herrero-Beites AM. Renal  
2067 underexcretion of uric acid is present in patients with apparent high urinary uric acid  
2068 output. Arthritis Rheum 2002;47(6):610-3.  
2069
- 2070 Yang CY, Chen CH, Deng ST, Huang CS, Lin YJ, Chen YJ *et al.* Allopurinol Use and  
2071 Risk of Fatal Hypersensitivity Reactions: A Nationwide Population-Based Study in  
2072 Taiwan. JAMA Intern Med 2015.  
2073
- 2084 Bardin T, Schiavon, Punzi L. Crystal arthropathies. In textbook on rheumatic disease.  
2075 2a ed. London-UK: BJM. 2012.344-58.  
2076
- 2097 Wang CP, Wang X, Zhang X, Shi YW, Liu L, Kong LD. Morin improves urate  
2078 excretion and kidney function through regulation of renal organic ion transporters in  
2079 hyperuricemic mice. J Pharm Pharm Sci 2010;13(3):411-27.  
2080
- 2001 Arafat OM, Tham SY, Sadikun A, Zhari I, Haughton PJ, Asmawi MZ. Studies on  
2082 diuretic and hypouricemic effects of *Orthosiphon stamineus* methanol extracts in rats. J  
2083 Ethnopharmacol 2008;118(3):354-60.

- 2084 Nishioka H, Fujii H, Sun B, Aruoma OI. Comparative efficacy of oligonol, catechin and  
2085 (-)-epigallocatechin 3-O-gallate in modulating the potassium bromate-induced renal  
2086 toxicity in rats. *Toxicology* 2006;226(2-3):181-7.  
2087
- 2088 Huang J, Wang S, Zhu M, Chen J, Zhu X. Effects of genistein, apigenin, quercetin, rutin  
2089 and astilbin on serum uric acid levels and xanthine oxidase activities in normal and  
2090 hyperuricemic mice. *Food Chem Toxicol* 2011;49(9):1943-7.  
2091
- 2092 Lopes, L.C, Albano F, Laranja GAT, Silva LFM, Souza GP, Araújo IM *et al.*  
2093 toxicological evaluation by in vitro and in vivo assays of an aqueous extract prepared  
2094 from *Echinodorus macrophyllus* leaves. *Toxicology Letters* 2000;116:189-98.  
2095
- 2096 Veiga Junior, V. F.; Pinto, A. C.; Maciel, M. A. M. plantas medicinais: cura segura?  
2097 química nova, v. 28, n. 3, p. 519-528, fev. 2005.  
2098
- 2099 Reinders MK, Van Roon EN, Jansen TL, Delsing J, Griep EN, Hoekstra M, *et al.*  
2100 Efficacy and tolerability of urate-lowering drugs in gout: a randomised controlled trial  
2101 of benzbromarone versus probenecid after failure of allopurinol. *Ann Rheum Dis*  
2102 2009;68(1):51-6.  
2103
- 2104
- 2105
- 2106
- 2107
- 2108
- 2109
- 2110
- 2111
- 2112
- 2113
- 2114
- 2115



## 2116 Figuras e tabelas do artigo científico 1

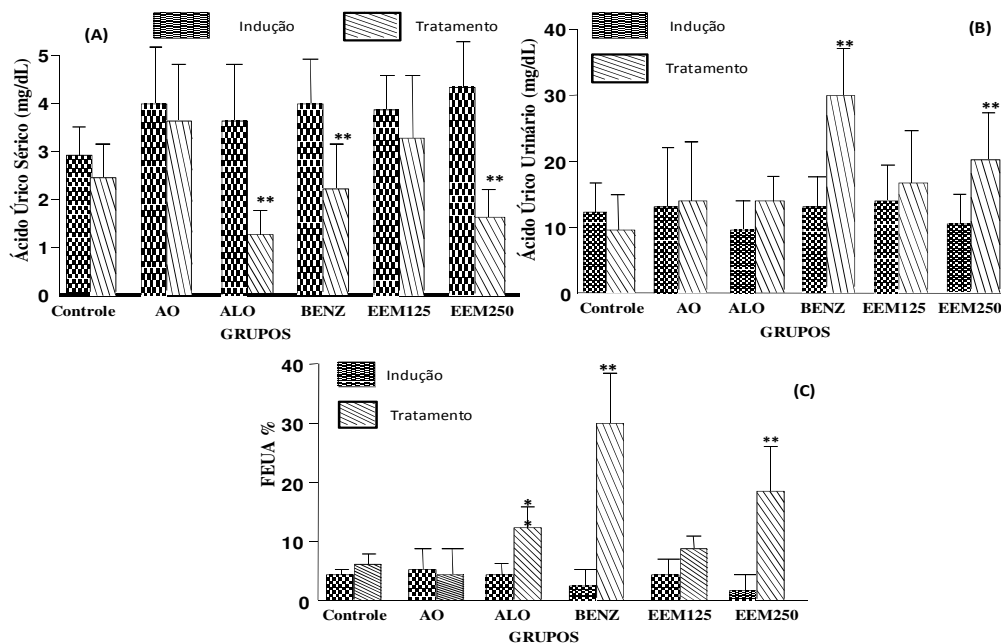


2117

2118 **Figura 1.** Perfil cromatográfico do extrato etanólico das folhas da *Echinodorus macrophyllus*, análise em CLAE-UV.  
 2119 Detecção a 254 nm (A). Flavonol - espectros de UV dos picos com tempo de retenção de 11,63 minutos (B) e 11,98  
 2120 minutos (C).

2121

2122



2123

2124

2125

2126

2127

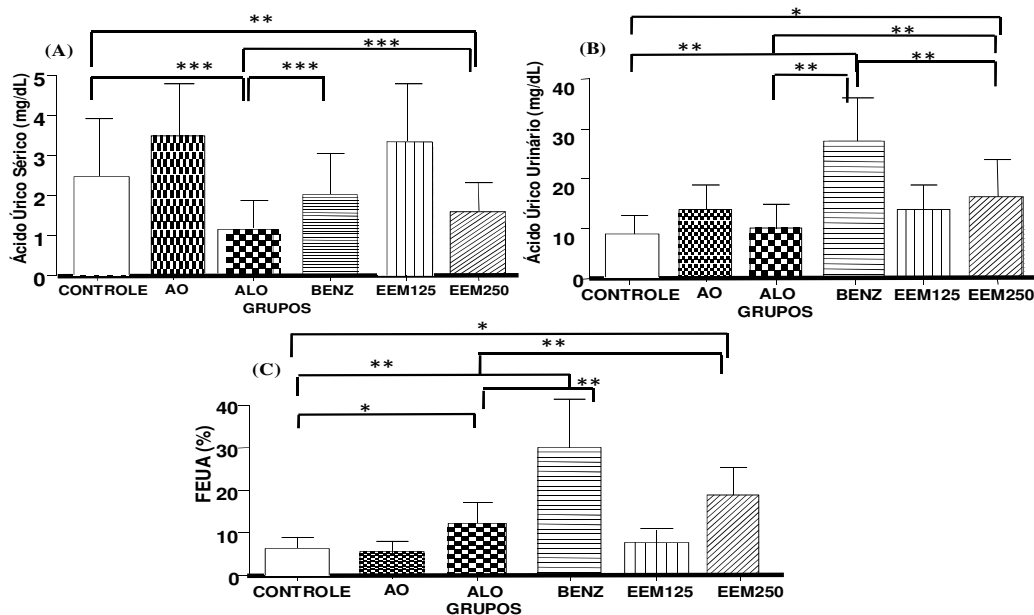
2128

2129

2130

2131

**Figura 2:** Comparação intragrupo nos momentos indução e tratamento em relação ao Ácido Úrico Sérico (mg/dL) (Figura A), Ácido Úrico Urinário (mg/dL) (Figura B) e FEUA% (Figura C). Controle: Grupo controle com ratos não hiperuricêmicos, AO: Grupo com ratos hiperuricêmicos sem tratamento; ALO: Grupo de ratos hiperuricêmicos tratados com alopurinol (10 mg/kg); BENZ: Grupo de ratos hiperuricêmicos tratados com benzobromarona (10 mg/kg); EEM125: Grupo de ratos hiperuricêmicos tratados com EEM 125 mg/kg; EEM250: Grupo de ratos hiperuricêmicos tratados com EEM 250 mg/kg. Os valores foram expressos em relação à média (n=5) e desvio padrão. \* P<0,05; \*\* P<0,01; \*\*\*P<0,001 versus a hiperuricemia induzida por AO.



2132  
 2133 **Figura 3:** Comparação dos grupos em relação ao efeito anti-hiperuricêmico em ratos hiperuricêmicos induzidos pelo  
 2134 ácido oxônico. Controle: Grupo controle, ALO: grupo tratados com alopurinol (10 mg/kg); BENZ: grupo tratados  
 2135 com benzobromarona (10 mg/kg); EEM125: grupo tratados com EEM 125 mg/kg; EEM250: grupo tratados com  
 2136 EEM 250 mg/kg. Os valores foram expressos em relação à média (n=5) e desvio padrão; \* P<0,05; \*\* P<0,01;  
 2137 \*\*\*P<0,001 versus a hiperuricemia induzida com AO.  
 2138

2139

2140 **Tabela 1:** Efeitos de EEM, alopurinol e Benzobromarona ao volume de urina, peso, colesterol,  
 2141 triglicerídeos, AST e ALT em ratos hiperuricêmicos

Grupos	Volume de Urina (mL)	Peso (gramas)	Colesterol Total (mg/dL)	Triglicerídeos (mg/dL)	AST (UI/L)	ALT (UI/L)
AO	15.80 <sup>b</sup>	307.20	203.60 <sup>a</sup>	153.00 <sup>ab</sup>	73.62	35.15 <sup>a</sup>
Controle	15.60 <sup>b</sup>	330.60	131.60 <sup>b</sup>	89.40 <sup>b</sup>	66.80	33.06 <sup>a</sup>
BENZ	28.40 <sup>a</sup>	316.80	176.00 <sup>a</sup>	227.60 <sup>a</sup>	81.96	32.51 <sup>a</sup>
AL	25.20 <sup>a</sup>	290.60	179.00 <sup>a</sup>	144.60 <sup>ab</sup>	79.44	37.79 <sup>a</sup>
EEM125	22.30 <sup>a</sup>	320.00	181.60 <sup>a</sup>	166.00 <sup>a</sup>	75.29	20.56 <sup>b</sup>
EEM250	19.50 <sup>ab</sup>	322.60	166.60 <sup>a</sup>	212.00 <sup>a</sup>	80.63	18.82 <sup>b</sup>
EPM	1.05	5.03	5.06	11.74	5.64	3.00
Valor de P <sup>1</sup>	0,001	0.266	0.005	0.011	0.601	0.004

2142 Grupos controle, ácido oxônico sem tratamento (AO) 250mg/kg, alopurinol (AL) 10mg/kg, extrato da EM 125mg/kg  
 2143 (EEM 125), extrato da EM 250mg/kg (EEM 250) e benzobromarona (BENZ) 10mg/kg. \*p<0,005 e \*\*p<0,001;<sup>2</sup>  
 2144 EPM ( Erro padrão da média). Médias seguidas de letras diferentes na linha diferenciam-se no teste de TUKEY  
 2145 ajustado pelo PROC MIXED do SAS

2146

2147

2148

2149

2150

## 2151 5.1.1 Normas da revista científica

2152



2153

### 2154 **Instructions for authors**

#### 2155 **Research articles**

2156 See '[About this journal](#)' for descriptions of different article types and information about  
2157 policies and the refereeing process.

#### 2158 **Submission process**

2159 Manuscripts must be submitted by one of the authors of the manuscript, and should not  
2160 be submitted by anyone on their behalf. The corresponding author takes responsibility  
2161 for the article during submission and peer review.

2162 Please note that all content published in *Arthritis Research & Therapy* is entirely open  
2163 access. *Arthritis Research & Therapy* levies an article-processing charge on all accepted  
2164 Research articles that have not been directly invited by the journal; if the corresponding  
2165 author's institution is a [BioMed Central member](#) the cost of the article-processing  
2166 charge may be covered by the membership (see [About](#) page for detail). Please note that  
2167 the membership is only automatically recognised on submission if the corresponding  
2168 author is based at the member institution. Authors of invited Research articles are enti-  
2169 tled to a full waiver on the journal article processing charge and should complete a  
2170 waiver request during the submission process.

2171 To facilitate rapid publication and to minimize administrative costs, *Arthritis Research*  
2172 *& Therapy* prefers [online submission](#).

2173 Files can be submitted as a batch, or one by one. The submission process can be inter-  
2174 rupted at any time; when users return to the site, they can carry on where they left off.

2175 See below for examples of [word processor](#) and [graphics file formats](#) that can be accept-  
2176 ed for the main manuscript document by the online submission system. Additional files  
2177 of any type, such as [movies](#), animations, or [original data files](#), can also be submitted as  
2178 part of the manuscript.

2179 During submission you will be asked to provide a cover letter. Use this to explain why  
2180 your manuscript should be published in the journal, to elaborate on any issues relating  
2181 to our editorial policies in the '[About Arthritis Research & Therapy](#)' page, and to declare  
2182 any potential competing interests.

2183 Assistance with the process of manuscript preparation and submission is available from  
2184 [BioMed Central customer support team](#).

2185 We also provide a collection of links to useful tools and resources for scientific authors  
2186 on our [Useful Tools](#) page.

#### 2187 **File formats**

2188 The following word processor file formats are acceptable for the main manuscript doc-  
2189 ument:

- 2190 • Microsoft word (DOC, DOCX)
- 2191 • Rich text format (RTF)
- 2192 • Portable document format (PDF)
- 2193 • TeX/LaTeX (use [BioMed Central's TeX template](#))

2194 TeX/LaTeX users: Please use [BioMed Central's TeX template](#) and BibTeX stylefile if  
2195 you use TeX format. During the TeX submission process, please submit your TeX file  
2196 as the main manuscript file and your bib/bbl file as a dependent file. Please also convert

2197 your TeX file into a PDF and submit this PDF as an additional file with the name  
 2198 'Reference PDF'. This PDF will be used by internal staff as a reference point to check  
 2199 the layout of the article as the author intended. Please also note that all figures must be  
 2200 coded at the end of the TeX file and not inline.

2201 If you have used another template for your manuscript, or if you do not wish to use  
 2202 BibTeX, then please submit your manuscript as a DVI file. We do not recommend con-  
 2203 verting to RTF.

2204 For all TeX submissions, all relevant editable source must be submitted during the sub-  
 2205 mission process. Failing to submit these source files will cause unnecessary delays in  
 2206 the publication procedures.

### 2207 **Preparing main manuscript text**

2208 General guidelines of the journal's style and language are given below.

### 2209 **Overview of manuscript sections for Research articles**

2210 Manuscripts for Research articles submitted to *Arthritis Research & Therapy* should be  
 2211 divided into the following sections (in this order):

- 2212 • Title page
- 2213 • Abstract
- 2214 • Keywords
- 2215 • Article headings
- 2216 • Introduction
- 2217 • Methods
- 2218 • Results and discussion
- 2219 • Conclusions
- 2220 • List of abbreviations used (if any)
- 2221 • Competing interests
- 2222 • Authors' contributions
- 2223 • Authors' information
- 2224 • Acknowledgements
- 2225 • Endnotes
- 2226 • References
- 2227 • Illustrations and figures (if any)
- 2228 • Tables and captions
- 2229 • Preparing additional files

2230 The **Accession Numbers** of any nucleic acid sequences, protein sequences or atomic  
 2231 coordinates cited in the manuscript should be provided, in square brackets and include  
 2232 the corresponding database name; for example, [EMBL:AB026295, EMBL:AC137000,  
 2233 DDBJ:AE000812, GenBank:U49845, PDB:1BFM, Swiss-Prot:Q96KQ7, PIR:S66116].

2234 The databases for which we can provide direct links are: EMBL Nucleotide Sequence  
 2235 Database (EMBL), DNA Data Bank of Japan (DDBJ), GenBank at the NCBI  
 2236 (GenBank), Protein Data Bank (PDB), Protein Information Resource (PIR) and the  
 2237 Swiss-Prot Protein Database (Swiss-Prot).

2238 For reporting standards please see the information in the About section.

### 2239 **Title page**

2240 The title page should list

- 2241 • the title of the article
- 2242 • the full names
- 2243 • institutional addresses
- 2244 • email addresses for all authors

2245 The corresponding author should also be indicated.

2246 Please note that the title should include the study design, for example "A versus B in the  
2247 treatment of C: a randomized controlled trial" or "X is a risk factor for Y: a case control  
2248 study". Please see the policy section in '[About Arthritis Research & Therapy](#)' for further  
2249 details.

2250 Please note that if a collaboration group should be listed as an author, please list the  
2251 Group name as an author. If you would like the names of the individual members of the  
2252 Group to be searchable through their individual PubMed records, please include this  
2253 information in the "acknowledgements" section in accordance with the instructions be-  
2254 low. Please note that the individual names may not may not be included in the PubMed  
2255 record at the time a published article is initially included in PubMed as it takes PubMed  
2256 additional time to code this information.

### 2257 **Abstract**

2258 The Abstract of the manuscript should not exceed 350 words and must be structured  
2259 into separate sections: **Introduction**, the context and purpose of the study; **Methods**,  
2260 how the study was performed and statistical tests used; **Results**, the main findings;  
2261 **Conclusions**, brief summary and potential implications; **Trial registration**, if your re-  
2262 search article reports the results of a controlled health care intervention, please list your  
2263 trial registry, along with the unique identifying number (e.g. **Trial registration**: Current  
2264 Controlled Trials ISRCTN73824458). Please note that there should be no space be-  
2265 tween the letters and numbers of your trial registration number. We recommend manu-  
2266 scripts that report randomized controlled trials follow the [CONSORT extension for ab-](#)  
2267 [stracts](#).

2268 Please minimize the use of abbreviations and do not cite references in the abstract.  
2269 Please see also our guide for writing an easily accessible [abstract](#).

### 2270 **Keywords**

2271 Three to ten keywords representing the main content of the article.

### 2272 **Introduction**

2273 The Introduction section should be written in a way that is accessible to researchers  
2274 without specialist knowledge in that area and must clearly state - and, if helpful, illus-  
2275 trate - the background to the research and its aims. Reports of clinical research should,  
2276 where appropriate, include a summary of a search of the literature to indicate why this  
2277 study was necessary and what it aimed to contribute to the field. The section should end  
2278 with a brief statement of what is being reported in the article.

### 2279 **Methods**

2280 The methods section should include the design of the study, the setting, the type of par-  
2281 ticipants or materials involved, a clear description of all interventions and comparisons,  
2282 and the type of analysis used, including a power calculation if appropriate. Generic drug  
2283 names should generally be used. When proprietary brands are used in research, include  
2284 the brand names in parentheses in the methods section.

2285 For further details of the journal's data-release policy, see the policy section in '[About](#)  
2286 [this journal](#)'.

### 2287 **Results and discussion**

2288 The Results and discussion may be combined into a single section or presented sepa-  
2289 rately. Results of statistical analysis should include, where appropriate, relative and ab-  
2290 solute risks or risk reductions, and confidence intervals. The Results and discussion sec-  
2291 tions may also be broken into subsections with short, informative headings.

### 2292 **Conclusions**

2293 This should state clearly the main conclusions of the research and give a clear explana-  
2294 tion of their importance and relevance. Summary illustrations may be included.

### 2295 **List of abbreviations**

2296 If abbreviations are used in the text they should be defined in the text at first use, and a  
 2297 list of abbreviations can be provided, which should precede the competing interests and  
 2298 authors' contributions.

### 2299 **Competing interests**

2300 A competing interest exists when your interpretation of data or presentation of infor-  
 2301 mation may be influenced by your personal or financial relationship with other people  
 2302 or organizations. Authors must disclose any financial competing interests; they should  
 2303 also reveal any non-financial competing interests that may cause them embarrassment  
 2304 were they to become public after the publication of the manuscript.

2305 Authors are required to complete a declaration of competing interests. All competing  
 2306 interests that are declared will be listed at the end of published articles. Where an author  
 2307 gives no competing interests, the listing will read 'The author(s) declare that they have  
 2308 no competing interests'.

2309 When completing your declaration, please consider the following questions:

#### 2310 *Financial competing interests*

- 2311 • In the past three years have you received reimbursements, fees, funding, or sala-  
 2312 rary from an organization that may in any way gain or lose financially from the  
 2313 publication of this manuscript, either now or in the future? Is such an organiza-  
 2314 tion financing this manuscript (including the article-processing charge)? If so,  
 2315 please specify.
- 2316 • Do you hold any stocks or shares in an organization that may in any way gain or  
 2317 lose financially from the publication of this manuscript, either now or in the fu-  
 2318 ture? If so, please specify.
- 2319 • Do you hold or are you currently applying for any patents relating to the content  
 2320 of the manuscript? Have you received reimbursements, fees, funding, or salary  
 2321 from an organization that holds or has applied for patents relating to the content  
 2322 of the manuscript? If so, please specify.
- 2323 • Do you have any other financial competing interests? If so, please specify.

#### 2324 *Non-financial competing interests*

2325 Are there any non-financial competing interests (political, personal, religious, ideologi-  
 2326 cal, academic, intellectual, commercial or any other) to declare in relation to this manu-  
 2327 script? If so, please specify.

2328 If you are unsure as to whether you, or one your co-authors, has a competing interest  
 2329 please discuss it with the editorial office.

### 2330 **Authors' contributions**

2331 In order to give appropriate credit to each author of a paper, the individual contributions  
 2332 of authors to the manuscript should be specified in this section.

2333 According to ICMJE guidelines, An 'author' is generally considered to be someone who  
 2334 has made substantive intellectual contributions to a published study. To qualify as an  
 2335 author one should 1) have made substantial contributions to conception and design, or  
 2336 acquisition of data, or analysis and interpretation of data; 2) have been involved in draft-  
 2337 ing the manuscript or revising it critically for important intellectual content; 3) have  
 2338 given final approval of the version to be published; and 4) agree to be accountable for  
 2339 all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of  
 2340 any part of the work are appropriately investigated and resolved. Each author should  
 2341 have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate  
 2342 portions of the content. Acquisition of funding, collection of data, or general supervi-  
 2343 sion of the research group, alone, does not justify authorship.

2344 We suggest the following kind of format (please use initials to refer to each author's  
 2345 contribution): AB carried out the molecular genetic studies, participated in the sequence

2346 alignment and drafted the manuscript. JY carried out the immunoassays. MT participat-  
2347 ed in the sequence alignment. ES participated in the design of the study and performed  
2348 the statistical analysis. FG conceived of the study, and participated in its design and  
2349 coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final  
2350 manuscript.

2351 All contributors who do not meet the criteria for authorship should be listed in an  
2352 acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a  
2353 person who provided purely technical help, writing assistance, a department chair who  
2354 provided only general support, or those who contributed as part of a large collaboration  
2355 group.

#### 2356 **Authors' information**

2357 You may choose to use this section to include any relevant information about the au-  
2358 thor(s) that may aid the reader's interpretation of the article, and understand the stand-  
2359 point of the author(s). This may include details about the authors' qualifications, current  
2360 positions they hold at institutions or societies, or any other relevant background infor-  
2361 mation. Please refer to authors using their initials. Note this section should not be used  
2362 to describe any competing interests.

#### 2363 **Acknowledgements**

2364 Please acknowledge anyone who contributed towards the article by making substantial  
2365 contributions to conception, design, acquisition of data, or analysis and interpretation of  
2366 data, or who was involved in drafting the manuscript or revising it critically for im-  
2367 portant intellectual content, but who does not meet the criteria for authorship. Please  
2368 also include the source(s) of funding for each author, and for the manuscript prepara-  
2369 tion. Authors must describe the role of the funding body, if any, in design, in the collec-  
2370 tion, analysis, and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the  
2371 decision to submit the manuscript for publication. Please also acknowledge anyone who  
2372 contributed materials essential for the study. If a language editor has made significant  
2373 revision of the manuscript, we recommend that you acknowledge the editor by name,  
2374 where possible.

2375 The role of a scientific (medical) writer must be included in the acknowledgements sec-  
2376 tion, including their source(s) of funding. We suggest wording such as 'We thank Jane  
2377 Doe who provided medical writing services on behalf of XYZ Pharmaceuticals Ltd.'

2378 If you would like the names of the individual members of a collaboration Group to be  
2379 searchable through their individual PubMed records, please ensure that the title of the  
2380 collaboration Group is included on the title page and in the submission system and also  
2381 include collaborating author names as the last paragraph of the "acknowledgements"  
2382 section. Please add authors in the format First Name, Middle initial(s) (optional), Last  
2383 Name. You can add institution or country information for each author if you wish, but  
2384 this should be consistent across all authors.

2385 Please note that individual names may not be present in the PubMed record at the time a  
2386 published article is initially included in PubMed as it takes PubMed additional time to  
2387 code this information.

2388 Authors should obtain permission to acknowledge from all those mentioned in the  
2389 Acknowledgements section.

#### 2390 **Endnotes**

2391 Endnotes should be designated within the text using a superscript lowercase letter and  
2392 all notes (along with their corresponding letter) should be included in the Endnotes sec-  
2393 tion. Please format this section in a paragraph rather than a list.

#### 2394 **References**

2395 All references, including URLs, must be numbered consecutively, in square brackets, in  
 2396 the order in which they are cited in the text, followed by any in tables or legends. Each  
 2397 reference must have an individual reference number. Please avoid excessive referenc-  
 2398 ing. If automatic numbering systems are used, the reference numbers must be finalized  
 2399 and the bibliography must be fully formatted before submission.

2400 Only articles, clinical trial registration records and abstracts that have been published or  
 2401 are in press, or are available through public e-print/preprint servers, may be cited; un-  
 2402 published abstracts, unpublished data and personal communications should not be in-  
 2403 cluded in the reference list, but may be included in the text and referred to as "un-  
 2404 published observations" or "personal communications" giving the names of the involved  
 2405 researchers. Obtaining permission to quote personal communications and unpublished  
 2406 data from the cited colleagues is the responsibility of the author. Footnotes are not al-  
 2407 lowed, but endnotes are permitted. Journal abbreviations follow Index  
 2408 Medicus/MEDLINE. Citations in the reference list should include all named authors, up  
 2409 to the first six before adding 'et al.'.

2410 Any *in press* articles cited within the references and necessary for the reviewers' as-  
 2411 sessment of the manuscript should be made available if requested by the editorial office.  
 2412 An Endnote style file is [available](#).

2413 Examples of the *Arthritis Research & Therapy* reference style are shown [below](#). Please  
 2414 ensure that the reference style is followed precisely; if the references are not in the cor-  
 2415 rect style they may have to be retyped and carefully proofread.

2416 All web links and URLs, including links to the authors' own websites, should be given a  
 2417 reference number and included in the reference list rather than within the text of the  
 2418 manuscript. They should be provided in full, including both the title of the site and the  
 2419 URL, as well as the date the site was accessed, in the following format: The Mouse  
 2420 Tumor Biology Database. <http://tumor.informatics.jax.org/mtbwi/index.do>. Accessed 20  
 2421 May 2013. If an author or group of authors can clearly be associated with a web link,  
 2422 such as for weblogs, then they should be included in the reference.

2423 Authors may wish to make use of reference management software to ensure that refer-  
 2424 ence lists are correctly formatted. An example of such software is [Papers](#), which is part  
 2425 of Springer Science+Business Media.

#### 2426 **Examples of the *Arthritis Research & Therapy* reference style**

2427 *Article within a journal* Smith JJ. The world of science. *Am J Sci.* 1999;36:234-5.

2428 *Article within a journal (no page numbers)* Rohrmann S, Overvad K, Bueno-de-  
 2429 Mesquita HB, Jakobsen MU, Egeberg R, Tjønneland A, et al. Meat consumption and  
 2430 mortality - results from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutri-  
 2431 tion. *BMC Medicine.* 2013;11:63.

2432 *Article within a journal by DOI* Slifka MK, Whitton JL. Clinical implications of  
 2433 dysregulated cytokine production. *Dig J Mol Med.* 2000; doi:10.1007/s801090000086.

2434 *Article within a journal supplement* Frumin AM, Nussbaum J, Esposito M. Functional  
 2435 asplenia: demonstration of splenic activity by bone marrow scan. *Blood* 1979;59 Suppl  
 2436 1:26-32.

2437 *Book chapter, or an article within a book* Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death:  
 2438 the significance of apoptosis. In: Bourne GH, Danielli JF, Jeon KW, editors. Interna-  
 2439 tional review of cytology. London: Academic; 1980. p. 251-306.

2440 *OnlineFirst chapter in a series (without a volume designation but with a DOI)*  
 2441 Saito Y, Hyuga H. Rate equation approaches to amplification of enantiomeric excess  
 2442 and chiral symmetry breaking. *Top Curr Chem.* 2007. doi:10.1007/128\_2006\_108.

2443 *Complete book, authored* Blenkinsopp A, Paxton P. Symptoms in the pharmacy: a guide  
 2444 to the management of common illness. 3rd ed. Oxford: Blackwell Science; 1998.



2445 *Online document* Doe J. Title of subordinate document. In: The dictionary of substances  
2446 and their effects. Royal Society of Chemistry. 1999. <http://www.rsc.org/dose/title>  
2447 of subordinate document. Accessed 15 Jan 1999.

2448 *Online database* Healthwise Knowledgebase. US Pharmacopeia, Rockville. 1998.  
2449 <http://www.healthwise.org>. Accessed 21 Sept 1998.

2450 *Supplementary material/private homepage* Doe J. Title of supplementary material.  
2451 2000. <http://www.privatehomepage.com>. Accessed 22 Feb 2000.

2452 *University site* Doe, J: Title of preprint. <http://www.uni-heidelberg.de/mydata.html>  
2453 (1999). Accessed 25 Dec 1999.

2454 *FTP site* Doe, J: Trivial HTTP, RFC2169. <ftp://ftp.isi.edu/in-notes/rfc2169.txt> (1999).  
2455 Accessed 12 Nov 1999.

2456 *Organization site* ISSN International Centre: The ISSN register. <http://www.issn.org>  
2457 (2006). Accessed 20 Feb 2007.

2458 *Dataset with persistent identifier* Zheng L-Y, Guo X-S, He B, Sun L-J, Peng Y, Dong  
2459 S-S, et al. Genome data from sweet and grain sorghum (*Sorghum bicolor*). GigaScience  
2460 Database. 2011. <http://dx.doi.org/10.5524/100012>.

### 2461 **Preparing illustrations and figures**

2462 Illustrations should be provided as separate files, not embedded in the text file. Each  
2463 figure should include a single illustration and should fit on a single page in portrait for-  
2464 mat. If a figure consists of separate parts, it is important that a single composite illustra-  
2465 tion file be submitted which contains all parts of the figure. There is no charge for the  
2466 use of color figures.

2467 Please read our [figure preparation guidelines](#) for detailed instructions on maximising the  
2468 quality of your [figures](#).

### 2469 **Formats**

2470 The following file formats can be accepted:

- 2471 • PDF (preferred format for diagrams)
- 2472 • DOCX/DOC (single page only)
- 2473 • PPTX/PPT (single slide only)
- 2474 • EPS
- 2475 • PNG (preferred format for photos or images)
- 2476 • TIFF
- 2477 • JPEG
- 2478 • BMP

2479 *Arthritis Research & Therapy* will edit all figures supplied by the author. For this reason  
2480 it is especially important that authors should supply figures in [vector form](#), to facilitate  
2481 such editing.

### 2482 **Figure legends**

2483 The legends should be included in the main manuscript text file at the end of the docu-  
2484 ment, rather than being a part of the figure file. For each figure, the following infor-  
2485 mation should be provided: Figure number (in sequence, using Arabic numerals - i.e.  
2486 Figure 1, 2, 3 etc); short title of figure (maximum 15 words); detailed legend, up to 300  
2487 words.

2488 **Please note that it is the responsibility of the author(s) to obtain permission from  
2489 the copyright holder to reproduce figures or tables that have previously been pub-  
2490 lished elsewhere.**

### 2491 **Display of Electrophoretic gels and blots**

2492 Each gel and blot included in a figure or additional data file should display appropriate  
2493 positive and negative controls in addition to molecular size markers and loading con-  
2494 trols. Gel or blot images must not be electronically enhanced or manipulated. Any ad-

2495 justments have to ensure that the final image is still a true representation of the original  
2496 data.

2497 Linear adjustment of the color, contrast or brightness are permitted, but they must be  
2498 applied to the entire image, not just parts of it.

2499 If gel or blots images have been cropped in order to improve the clarity of a figure, the  
2500 cropping must be explained in the figure legend; any important bands must be included  
2501 in the cropped figure. The complete gels and blots should be provided as additional data  
2502 files and referred to from the legend of the corresponding figure in the main text.

2503 If lanes are displayed together in an image that were not adjacent in the original gel, the  
2504 lanes must be separated clearly by lines and a note must be added to the figure legend.

2505 If previously characterized antibodies were used, a reference must be included in the  
2506 article. If less well known reagents were used, antibody specificity and its reactivity in  
2507 the actual assay should be included in the article.

2508 If quantitative comparisons between samples shown on different gels or blots have to be  
2509 made, this must be made explicit in the figure legends.

### 2510 **Preparing tables**

2511 Each table should be numbered and cited in sequence using Arabic numerals (i.e. Table  
2512 1, 2, 3 etc.). Tables should also have a title (above the table) that summarizes the whole  
2513 table; it should be no longer than 15 words. Detailed legends may then follow, but they  
2514 should be concise. Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.  
2515 Smaller tables considered to be integral to the manuscript can be pasted into the end of  
2516 the document text file, in A4 portrait or landscape format. These will be typeset and  
2517 displayed in the final published form of the article. Such tables should be formatted us-  
2518 ing the 'Table object' in a word processing program to ensure that columns of data are  
2519 kept aligned when the file is sent electronically for review; this will not always be the  
2520 case if columns are generated by simply using tabs to separate text. Columns and rows  
2521 of data should be made visibly distinct by ensuring that the borders of each cell display  
2522 as black lines. Commas should not be used to indicate numerical values. Color and  
2523 shading may not be used; parts of the table can be highlighted using symbols or bold  
2524 text, the meaning of which should be explained in a table legend. Tables should not be  
2525 embedded as figures or spreadsheet files.

2526 Larger datasets or tables too wide for a landscape page can be uploaded separately as  
2527 additional files. Additional files will not be displayed in the final, laid-out PDF of the  
2528 article, but a link will be provided to the files as supplied by the author.

2529 Tabular data provided as additional files can be uploaded as an Excel spreadsheet (.xls )  
2530 or comma separated values (.csv). As with all files, please use the standard file exten-  
2531 sions.

### 2532 **Preparing additional files**

2533 Although *Arthritis Research & Therapy* does not restrict the length and quantity of data  
2534 included in an article, we encourage authors to provide datasets, tables, movies, or other  
2535 information as additional files.

2536 Please note: All Additional files **will be published** along with the article. Do not in-  
2537 clude files such as patient consent forms, certificates of language editing, or revised  
2538 versions of the main manuscript document with tracked changes. Such files should be  
2539 sent by email to [editorial@arthritis-research.com](mailto:editorial@arthritis-research.com), quoting the Manuscript ID number.

2540 Results that would otherwise be indicated as "data not shown" can and should be in-  
2541 cluded as additional files. Since many weblinks and URLs rapidly become broken, *Ar-*  
2542 *thritis Research & Therapy* requires that supporting data are included as additional files,  
2543 or deposited in a recognized repository. Please do not link to data on a person-

2544 al/departmental website. The maximum file size for additional files is 20 MB each, and  
2545 files will be virus-scanned on submission.

2546 Additional files can be in any format, and will be downloadable from the final published  
2547 article as supplied by the author.

2548 Certain supported files formats are recognized and can be displayed to the user in the  
2549 browser. These include most movie formats (for users with the Quicktime plugin), mini-  
2550 websites prepared according to our guidelines, chemical structure files (MOL, PDB),  
2551 geographic data files (KML).

2552 If additional material is provided, please list the following information in a separate  
2553 section of the manuscript text:

- 2554 • File name (e.g. Additional file 1)
- 2555 • File format including the correct file extension for example .pdf, .xls, .txt, .pptx  
2556 (including name and a URL of an appropriate viewer if format is unusual)
- 2557 • Title of data
- 2558 • Description of data

2559 Additional files should be named "Additional file 1" and so on and should be referenced  
2560 explicitly by file name within the body of the article, e.g. 'An additional movie file  
2561 shows this in more detail [see Additional file 1]'.  
2562

### 2562 **Additional file formats**

2563 Ideally, file formats for additional files should not be platform-specific, and should be  
2564 viewable using free or widely available tools. The following are examples of suitable  
2565 formats.

- 2566 • Additional documentation
  - 2567 ○ PDF (Adode Acrobat)
- 2568 • Animations
  - 2569 ○ SWF (Shockwave Flash)
- 2570 • Movies
  - 2571 ○ MP4 (MPEG 4)
  - 2572 ○ MOV (Quicktime)
- 2573 • Tabular data
  - 2574 ○ XLS, XLSX (Excel Spreadsheet)
  - 2575 ○ CSV (Comma separated values)

2576 As with figure files, files should be given the standard file extensions.

### 2577 **Mini-websites**

2578 Small self-contained websites can be submitted as additional files, in such a way that  
2579 they will be browsable from within the full text HTML version of the article. In order to  
2580 do this, please follow these instructions:

- 2581 1. Create a folder containing a starting file called index.html (or index.htm) in the  
2582 root.
- 2583 2. Put all files necessary for viewing the mini-website within the folder, or sub-  
2584 folders.
- 2585 3. Ensure that all links are relative (ie "images/picture.jpg" rather than  
2586 "/images/picture.jpg" or "http://yourdomain.net/images/picture.jpg" or  
2587 "C:\Documents and Settings\username\My Documents\mini-  
2588 website\images\picture.jpg") and no link is longer than 255 characters.
- 2589 4. Access the index.html file and browse around the mini-website, to ensure that  
2590 the most commonly used browsers (Internet Explorer and Firefox) are able to  
2591 view all parts of the mini-website without problems, it is ideal to check this on a  
2592 different machine.

- 2593 5. Compress the folder into a ZIP, check the file size is under 20 MB, ensure that  
2594 index.html is in the root of the ZIP, and that the file has .zip extension, then  
2595 submit as an additional file with your article.

## 2596 **Style and language**

### 2597 **General**

2598 Currently, *Arthritis Research & Therapy* can only accept manuscripts written in Eng-  
2599 lish. Spelling should be US English or British English, but not a mixture.

2600 There is no explicit limit on the length of articles submitted, but authors are encouraged  
2601 to be concise.

### 2602 **Help and advice on scientific writing**

2603 The abstract is one of the most important parts of a manuscript. For guidance, please  
2604 visit our page on [Writing titles and abstracts for scientific articles](#).

2605 Tim Albert has produced for BioMed Central a [list of tips](#) for writing a scientific manu-  
2606 script. [American Scientist](#) also provides a list of resources for science writing. For more  
2607 detailed guidance on preparing a manuscript and writing in English, please visit the [Bi-  
2608 oMed Central author academy](#).

### 2609 **Abbreviations**

2610 Abbreviations should be used as sparingly as possible. They should be defined when  
2611 first used and a list of abbreviations can be provided following the main manuscript  
2612 text.

### 2613 **Typography**

- 2614 • Please use double line spacing.
- 2615 • Type the text unjustified, without hyphenating words at line breaks.
- 2616 • Use hard returns only to end headings and paragraphs, not to rearrange lines.
- 2617 • Capitalize only the first word, and proper nouns, in the title.
- 2618 • All pages should be numbered.
- 2619 • Use the *Arthritis Research & Therapy* [reference format](#).
- 2620 • Footnotes are not allowed, but endnotes are permitted.
- 2621 • Please do not format the text in multiple columns.
- 2622 • Greek and other special characters may be included. If you are unable to repro-  
2623 duce a particular special character, please type out the name of the symbol in  
2624 full. **Please ensure that all special characters used are embedded in the text,  
2625 otherwise they will be lost during conversion to PDF.**

### 2626 **Units**

2627 SI units should be used throughout (liter and molar are permitted, however).

2628

2629

2630

2631

2632 **5.2 Artigo científico 2**2633 **Evaluation of the toxicokinetics and apoptotic potential of the ethanol extract from**  
2634 ***Echinodorus macrophyllus* leaves *in vivo*.**

2635

2636 Márcia Soares Mattos Vaz<sup>1</sup>, Mário Sérgio Vaz da Silva<sup>1</sup>, Rodrigo Juliano Oliveira<sup>2</sup>, Jo-  
2637 nas da Silva Mota<sup>3</sup>, Débora Regina Hoff Brait<sup>1</sup>, Juliana Miron Vani<sup>2</sup>, Claudia Rodrigues  
2638 Berno<sup>2</sup>, Flávio Henrique Souza Araújo<sup>2</sup>, Márcio Eduardo de Barros<sup>1,4</sup>.

2639

2640 <sup>1</sup> Faculty of Health Sciences, Federal University of Grande Dourados - Dourados, Mato  
2641 Grosso do Sul, Brazil.2642 <sup>2</sup> Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, MS, Brazil2643 <sup>3</sup> Centre for Research on Biodiversity (CPBIO), State University of Mato Grosso do Sul  
2644 (UEMS) - Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil.2645 <sup>4</sup> University Hospital of the Federal University of Grande Dourados - Dourados, Mato  
2646 Grosso do Sul.

2647

2648

2649

2650 Corresponding author: Marcio Eduardo De Barros.

2651 Faculdade de Ciências da Saúde.

2652 Rodovia Dourados – Ithau, Km 12, Cidade Universitária.

2653 Dourados – MS.

2654 CEP: 79800-000.

2655 ([marciobarros@ufgd.edu.br](mailto:marciobarros@ufgd.edu.br))

2656

2657

2658 **ABSTRACT**2659 The aim of this study was to evaluate the toxicological, genotoxic, mutagenic  
2660 and apoptotic potential of *in vivo* *Echinodorus macrophyllus* extract (EEM). In acute  
2661 toxicity test, 02 groups (n = 5) of female Wistar rats were used, a negative control group  
2662 (saline) and an experimental group (2000 mg / kg / BW of EEM), followed by 14 days.  
2663 In genotoxic, mutagenic and apoptosis potential, 50 male Swiss mice were divided into  
2664 5 groups (n = 10): Group I: negative control (saline 0.1ml / 10g / PC); Group II: positive  
2665 control group (cyclophosphamide 100 mg / kg); Group III: EEM 500 mg / kg; Group  
2666 IV: EEM 1000 mg / kg; Group V: EEM 2000 mg / kg. The results showed that there  
2667 were no acute lethality or toxicity signals, indicating that LD<sub>50</sub> is greater than 2000 mg /  
2668 kg, and groups treated with EEM showed no genotoxic or mutagenic activity and did  
2669 not induce apoptosis in liver and kidney. It is concluded that EEM shows no toxicity  
2670 and its LD<sub>50</sub> is greater than 2000 mg / kg, with no mutagenicity and genotoxicity at dos-  
2671 ages of 500, 1,000 and 2,000 mg / kg / BW and no apoptotic effects.

2672

2673

2674 **Keywords:** *Echinodorus macrophyllus*, acute toxicity, LD50, comet assay, micronucle-  
2675 us test, genotoxicity, mutagenicity.

2676

2677

## 2678 **1. Introduction**

2679           Currently, there has been an increased demand for the use of natural products,  
2680 especially vegetables, as a therapeutic option due to their potentially beneficial effects  
2681 on human health. However, they may have in their chemical constitution compounds  
2682 that may have deleterious effects that bring serious risks to human health (Brusick,  
2683 1987; Rates, 2001). In this sense, any agent that can harm the patient's health should be  
2684 evaluated to detect any toxic, genotoxic or mutagenic effect. Mutagenic agents can  
2685 change the DNA sequence and thereby increase or accelerate mutation that when accu-  
2686 mulated and in large numbers and can determine the appearance of cancerous tumors  
2687 (Ribeiro et al., 2003).

2688           *Echinodorus macrophyllus* (Kunt) Micheli (Alismataceae family), popularly  
2689 known as "Amazon sword plant", is a medicinal plant that abundantly grows in Brazil  
2690 and is used in folk medicine in many situations as an astringent, diuretic, antiarrhyth-  
2691 mic, in rheumatoid arthritis, in atherosclerosis, in skin infections, in respiratory, liver  
2692 and urinary tract diseases (lithiasis and nephrolithiasis) (Buznego and Pérez-Saad, 2006;  
2693 Leite et al, 2007) and also used to reduce serum uric acid (Coimbra and Cassiani, 2001).

2694           The methanolic extract from *Echinodorus macrophyllus* leaves (*E.*  
2695 *macrophyllus*) has mainly flavonoids, triterpenoids, tannins (Martins et al.), as well as  
2696 alkaloids, glycosides, essential oils, saponins, polyphenols, steroids, and organic acids  
2697 (Kobayashi et al., 2000).

2698           Studies carried out by Portela et al. (2012) and Nascimento et al. (2014) demon-  
2699 strate scientific evidence that *E. macrophyllus* has nephroprotective activity, indicating  
2700 that it may have therapeutic applications in renal dysfunction. Pinto et al. (2007) also  
2701 reported that the aerial parts of *E. macrophyllus* have immunosuppressive effect on the  
2702 exacerbated humoral response or cellular immune responses, and in autoimmune rheu-  
2703 matic diseases.

2704           In view of the therapeutic potential of *E. macrophyllus*, this study was conducted  
2705 to evaluate the toxicological potential of this extract through acute toxicity,  
2706 genotoxicity, mutagenicity tests and *in vivo* apoptotic effects.

2707

## 2708 **2. Material and Methods**

### 2709 **2.1. Plant material, preparation and High-performance Liquid Chromatography**

2710           *E. macrophyllus* leaves of were collected in the region of Dourados, Mato  
2711 Grosso do Sul, Brazil (22 ° 14'S and 54° 45'W and 452 m asl) in the first half of April

2712 2014. The species was identified by Dr. Zefa Valdivina Pereira and deposited under  
2713 identification number 2085 in the herbarium of the Faculty of Biological and Environ-  
2714 mental Sciences (FCBA), Federal University of Grande Dourados / Dourados / MS.

2715 *E. macrophyllus* leaves were dried and macerated at room temperature and sub-  
2716 sequently sprayed with the aid of a mill, obtaining about 500 g of pulverized material  
2717 that was submitted to three extractions with ethanol (92.8%), each using 2 L of solvent.  
2718 The resulting solutions were concentrated on a rotary evaporator, obtaining 55 g of eth-  
2719 anol extract from *Echinodorus macrophyllus* (EEM), with 9.09% of yield.

2720 Chromatographic analysis used High-performance Liquid Chromatograph  
2721 (HPLC) model Shimadzu LC6A with diode array detector (DAD) and scanning between  
2722 200 and 800 nm. Phenomenex Column C-18 (4.6 mm x 250 mm, particle diameter of 10  
2723  $\mu\text{m}$ ) and pre-column (25 mm x 3 mm) of the same column phase. Elution was carried  
2724 out in gradient system: MeOH / H<sub>2</sub>O from 5 to 100% methanol, taking 15 minutes to  
2725 reach 100% methanol, remaining 5 minutes at 100% methanol and 5 minutes to return  
2726 to initial conditions. The total analysis time was 25 minutes, pump flow rate of 1 ml /  
2727 min and injected volume of 5  $\mu\text{L}$ . Samples were filtered with a micro-filter of 0.20  $\mu\text{m}$ .

2728

## 2729 **2.2. Animals**

2730 Ten female adult Wistar rats with average weight of 250g were used in the acute  
2731 toxicity study and fifty male Swiss mice with average weight between 30 and 40 g were  
2732 used for the comet assay, micronuclei and apoptosis. The animals were provided by the  
2733 animal facility of the Federal University of Grande Dourados (UFGD). The animals  
2734 were kept in polypropylene cages covered with shaver for a minimum adaptation period  
2735 of 7 days. Light and temperature were controlled with 12 h light and 12 h dark, main-  
2736 taining temperature ( $22 \pm 2$  ° C) and humidity ( $55 \pm 10\%$ ) constant. Throughout the  
2737 experiment, animals received commercial diet and filtered water *ad libitum*. The exper-  
2738 imental procedures were in accordance with the Ethical Principles for Animal Experi-  
2739 mentation and approved by the Ethics Research Committee on Animal Use the UFGD  
2740 (Protocol no. 015/2014).

2741

## 2742 **2.3 Acute Toxicity**

2743 The acute toxicity study was based on OECD protocols (Organization for Eco-  
2744 nomic Co-operation and Development) - Guidelines 425 and ANVISA (OECD, 2008,  
2745 ANVISA, 2004).

2746 For the acute toxicity study, animals were randomized and divided into 2 groups  
2747 of experimental rats (n = 5), which remained fasting for 8 hours before the experiment.  
2748 substances were administered by oesophageal gavage. The first group (control group)  
2749 was treated with saline solution (0.9 g NaCl, 100 ml of water). The second group (ex-  
2750 perimental) was orally treated with EEM diluted in saline at dose of 2000 mg / kg body  
2751 weight, termed EEM 2000 mg / kg group. Extract administration was firstly carried out  
2752 in a single female rat. Then, with an interval of 48 hours, the same dose was adminis-  
2753 tered to four more rats, totaling five animals treated in EEM 2000 mg / Kg group. Ani-  
2754 mals were periodically observed during the first 24 hours and thereafter once daily for  
2755 14 days.

2756 According to Malone and Robichaud (1962), the five hippocratic screening pa-  
2757 rameters were analyzed: conscious state (general activity); Activity and Coordination of  
2758 the Motor System and Muscle Tone (touch response and tail clamping, straightening,  
2759 grip strength); Reflexes (atrial and corneal); Activities on the Central Nervous System  
2760 (tremors, convulsions, straub, sedation, anesthesia and ataxia) and Activities on the Au-  
2761 tonomic Nervous System (lacrimation, cyanosis, ptosis, salivation and piloerection).  
2762 Water and food consumption and body weight were daily recorded. At the end of the  
2763 observation period, all animals were anesthetized (Ketamine and xylazine, 25 and 10  
2764 mg / kg, respectively) and sacrificed by decapitation. Organs (heart, lung, spleen, liver,  
2765 kidney, right ovary and uterus) were removed, weighed and macroscopically examined.  
2766 The average lethal dose was estimated according to method described by Litchfield and  
2767 Wilcoxon (Litchfield and Wilcoxon, 1949).

2768 Assessments of body weight and absolute and relative weights of organs were  
2769 used to define the biometric parameters of animals at the beginning and end of the ex-  
2770 periment.

2771

#### 2772 **2.4 Comet tests, micronucleus in peripheral blood and apoptotic Assessment of** 2773 **Liver and Kidneys**

2774 Animals (Swiss mice) were randomized into 5 experimental groups (n = 10), and  
2775 substances saline [(0.1 mL / 10 g body weight) (Negative Control Group - Group I)] and  
2776 EEM (Groups - I, II, III, IV and V at doses of 500, 1000 and 2000 mg / kg respectively)  
2777 were administered by gavage and cyclophosphamide [(100 mg / kg body weight) (Posi-  
2778 tive Control Group - Group II)] was intraperitoneally administered.



2779 EEM doses were based on the LD50 determination, which was higher than 2000  
2780 mg / kg. Treatment was performed once, and the *Echinodorus macrophyllus* extract and  
2781 cyclophosphamide were dissolved in saline prior to administration.

2782 Alkylating cyclophosphamide agent (Fosfaseron, Filaxis) was used to promote  
2783 DNA damage, which has demonstrated *in vivo* and *in vitro* genotoxic activity in bone  
2784 marrow cells and peripheral blood of rats (Fenech et al., 1999).

2785 The apoptotic evaluation of liver and kidney was analyzed by DNA fragmenta-  
2786 tion in accordance with protocols of Rovozzo, Burke (1973) and Mauro et al (2011).

2787

#### 2788 **2.4.1 Comet assay**

2789 The comet assay was performed according to Singh et al. (1988); Tice and  
2790 Strauss (1995) and Oliveira et al. (2009). First, slides were covered with agarose (5%),  
2791 then 20 µL of peripheral blood were collected 24 h after administration of the com-  
2792 pounds (T1), which were homogenized with 120 µL of low-point agarose and deposited  
2793 on the slide, being covered with coverslip and cooled to -4 ° C for 20 minutes in the  
2794 absence of light. The coverslip was removed and the blade immersed in 89 ml of stock  
2795 lysis solution (2.5M NaCl, 100.0 mM EDTA, 10.0 mM Tris, pH 10 adjusted with solid  
2796 NaOH, 890 ml of distilled water and 1% sodium lauryl sarcosinate), 1.0 ml Triton X -  
2797 100 and 10 mL of DMSO protected from light for a period of at least 1 hour and up to  
2798 24 hours. Then, they were taken to the electrophoresis tank with pH buffer > 13.0 for a  
2799 period of 20 minutes at 4 ° C; the electrophoresis run was performed at 25 V and 300  
2800 mA (1.25 V / cm). After the run, slides were neutralized with pH 7.5 buffer (0.4 M Tris-  
2801 HCl) for 3 cycles of five minute and fixed in absolute ethanol. Slides were stained with  
2802 100 µL ethidium bromide (20 µg / ml). The analysis of 200 cells / animal was per-  
2803 formed in epifluorescence microscope with 40x magnification, 420-490 nm excitation  
2804 filter and 520 nm barrier filter. The presence of comets was given according to classifi-  
2805 cation as follows: (Class 0) undamaged cells showing no tail; (Class 1) cells with tail  
2806 cell size lower than the nucleoid diameter; (Class 2) cells with tail size 1-2 times the  
2807 nucleoid diameter and (Class 3) cells with tail size larger than twice the nucleoid diame-  
2808 ter. The score per group was determined from the sum of these damages times their  
2809 class.

#### 2810 **2.4.2 Micronucleus test in peripheral blood**

2811 The technique used was based on Hayashi et al. (1990) and Oliveira et al.  
2812 (2009). About 20 µL of peripheral blood were collected by puncture of the tail vein and

2813 deposited on slide previously stained with acridine orange (1 mg / ml) and then covered  
2814 with coverslip. Samples were collected at three different times at 24 (T1), 48 (T2) and  
2815 72 (T3) hours after administration of saline, cyclophosphamide and EEM. Slides were  
2816 stored at -20 ° C for at least 15 days.

2817 To assess the mutagenic potential, it was observed for each blade at each treat-  
2818 ment time (24h, 48h, and 72h), 2000 cells per animal regarding the presence of micro-  
2819 nuclei under epifluorescence microscope with 400x magnification equipped with excita-  
2820 tion filter of 420 nm and 490 nm and barrier filter of 520 nm.

2821

### 2822 **2.4.3 Apoptotic Evaluation**

2823 Liver and kidney were macerated and 100 µL of this product were used in the  
2824 slide smear. The slide was fixed in Carnoy's solution for 5 min and submitted to a gradi-  
2825 ent of decreasing ethanol concentrations (95% -25%), washed with McIlvaine buffer for  
2826 5 minutes and stained with acridine orange (0.01%, 5 minutes). Apoptotic cells were  
2827 identified by analysis of DNA fragmentation patterns according to Rovozzo and  
2828 Luginbuhl (1965) and Mauro et al. (2011). One thousand cells per animal were analyzed  
2829 under 400x magnification under epifluorescence microscope (Bioval model 2000A L)  
2830 equipped with excitation filter of 420-490 nm and barrier filter of 520 nm.

2831

### 2832 **2.5. Statistical analysis**

2833 The results were expressed as mean ± standard error of the mean. To compare  
2834 two groups, the "t" Student test was used. For non-parametric data, ANOVA followed  
2835 by Tukey test were used. A 5% significance level was adopted.

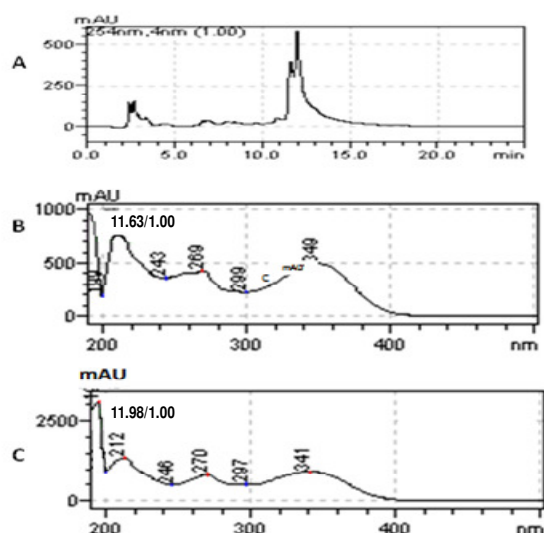
2836

2837

## 2838 **3. RESULTS**

### 2839 **3.1 Analysis of extracts by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)**

2840 In the HPLC analysis (254.4 nm), EEM showed compounds compatible with  
2841 flavonoids (Figure 1A), with spectra in the ultraviolet region of compounds with reten-  
2842 tion time of 11.63 and 11.98 minutes (1B and 1C), being typical of flavonol-type flavo-  
2843 noid (Figure 1).



2844

2845 **Figure 1.** Chromatographic profile of the ethanol extract of *Echinodorus macrophyllus*  
 2846 leaves analyzed on HPLC-UV. Detection at 254 nm (A). Flavanol - UV spectra of peaks  
 2847 with retention times of 11.63 minute (B) and 11.98 minutes (C).

2848

### 2849 3.2 Acute Toxicity

2850 After the acute toxicity test with EEM at dose of 2000 mg / kg, no signs of tox-  
 2851 icity or death of animals were observed either immediately after the experiment or dur-  
 2852 ing the observation period. Female rats showed no behavioral change, in addition, wa-  
 2853 ter and food consumption was not statistically different between control group and EEM  
 2854 group, respectively. There was no statistical difference in relation to body weight and  
 2855 organ weights between groups, being within the normal range. Macroscopic analysis  
 2856 showed no changes in organs.

2857

### 2858 3.3 Biometric Parameters

2859 The biometric parameter of groups showed no statistical difference between the  
 2860 mean body weight values of mice at the beginning and end of the experiment. Compar-  
 2861 ing the absolute and relative weights (Table 1), only spleen in the positive control group  
 2862 treated with a single dose of cyclophosphamide (100 mg / kg) showed a statistically  
 2863 lower weight ( $p < 0.05$ ) compared to the other groups. However, the experimental  
 2864 groups with EEM were similar to the negative control group.

2865

2866

2867

2868

2869 **Table 1:** Absolute and relative weight of Swiss mice organs after the experiment.

Experimental Groups	Heart (g)	Liver (g)	Kidneys (g)	Lung (g)	Spleen (g)
<b><u>Absolute Weigth</u></b>					
Negative Control	0,22±0,01 <sup>a</sup>	2,33±0,08 <sup>a</sup>	0,62±0,02 <sup>a</sup>	0,28±0,01 <sup>a</sup>	0,19±0,02 <sup>b</sup>
Positive Control	0,21±0,01 <sup>a</sup>	2,12±0,08 <sup>a</sup>	0,62±0,02 <sup>a</sup>	0,29±0,01 <sup>a</sup>	0,10±0,01 <sup>a</sup>
500 mg/kg EEM	0,23±0,01 <sup>a</sup>	2,16±0,12 <sup>a</sup>	0,63±0,03 <sup>a</sup>	0,29±0,01 <sup>a</sup>	0,20±0,01 <sup>b</sup>
1000 mg/kg EEM	0,21±0,01 <sup>a</sup>	2,20±0,05 <sup>a</sup>	0,63±0,03 <sup>a</sup>	0,31±0,01 <sup>a</sup>	0,19±0,01 <sup>b</sup>
2000 mg/kg EEM	0,22±0,01 <sup>a</sup>	2,33±0,08 <sup>a</sup>	0,64±0,02 <sup>a</sup>	0,32±0,01 <sup>a</sup>	0,18±0,01 <sup>b</sup>
<b><u>Relative Weigth</u></b>					
Negative Control	0,005±0,0003 <sup>a</sup>	0,05±0,002 <sup>a</sup>	0,01±0,0005 <sup>a</sup>	0,006±0,0004 <sup>a</sup>	0,004±0,0003 <sup>b</sup>
Positive Control	0,005±0,0003 <sup>a</sup>	0,05±0,002 <sup>a</sup>	0,01±0,0007 <sup>a</sup>	0,007±0,0005 <sup>a</sup>	0,002±0,0002 <sup>a</sup>
500 mg/kg EEM	0,005±0,0003 <sup>a</sup>	0,05±0,003 <sup>a</sup>	0,01±0,0005 <sup>a</sup>	0,007±0,0003 <sup>a</sup>	0,005±0,0002 <sup>b</sup>
1000 mg/kg EEM	0,005±0,0003 <sup>a</sup>	0,05±0,001 <sup>a</sup>	0,01±0,0004 <sup>a</sup>	0,007±0,0004 <sup>a</sup>	0,004±0,0003 <sup>b</sup>
2000 mg/kg EEM	0,005±0,0003 <sup>a</sup>	0,05±0,002 <sup>a</sup>	0,01±0,0004 <sup>a</sup>	0,007±0,0005 <sup>a</sup>	0,004±0,0002 <sup>a,b</sup>

2870

2871 Values expressed as mean±standard error; Different letters indicate statistically signifi-  
 2872 cant difference (p <0.05; ANOVA / Tukey). EEM - *E. marcrophyllus* extract.

2873

2874

### 2875 3.4 Comet assay

2876 Table 2 shows the mean ± standard error of the frequency of damaged cells after  
 2877 24 hours (T1), 48 hours (T2) and 72h (T3) of treatment with EEM and distribution be-  
 2878 tween DNA damage classes related to the comet assay in the peripheral blood of mice.  
 2879 EEM caused no genotoxic damage in cells of groups receiving 500, 1000 and 2000 mg /  
 2880 kg, once animals maintained their average values statistically similar to averages of the  
 2881 negative control group and different from group treated with cyclophosphamide (p  
 2882 <0.05). As expected, the positive control group showed DNA damage compared to  
 2883 groups treated with EEM at different doses.

2884

2885

2886

2887

2888

2889

2890

2891 **Table 2:** Damage frequency in 200 cells / animal by the comet assay in Swiss mice  
 2892 orally treated with *Echinodorus macrophyllus* extract.

Experimental Groups	Cellular Damage	Damage Classes				Score
		0	1	2	3	
Negative Control	14.1 ± 0.93 <sup>a</sup>	85.9 ± 0.93	8.9 ± 0.97	5.2 ± 1.22	0.0 ± 0.00	19.3 ± 1.94 <sup>a</sup>
Positive Control	85.7 ± 1.27 <sup>b</sup>	14.3 ± 1.27	49.7 ± 2.61	29.7 ± 2.93	6.3 ± 1.22	128.0 ± 4.17 <sup>b</sup>
500 mg/kg EEM	19.4 ± 2.15 <sup>a</sup>	80.6 ± 2.15	12.3 ± 2.02	6.0 ± 1.42	1.1 ± 0.67	27.6 ± 3.24 <sup>a</sup>
1000 mg/kg EEM	19.0 ± 1.97 <sup>a</sup>	81.0 ± 1.97	12.5 ± 1.05	6.5 ± 1.45	0.0 ± 0.00	26.3 ± 3.40 <sup>a</sup>
2000 mg/kg EEM	16.5 ± 2.59 <sup>a</sup>	83.5 ± 2.59	12.5 ± 1.76	2.8 ± 1.16	1.2 ± 0.47	21.7 ± 3.75 <sup>a</sup>

2893

2894 Values expressed as mean ± standard error; Different letters indicate statistically signifi-  
 2895 cant difference (p <0.05; ANOVA / Tukey). Class 0 - no damage; Class 1 - comet tail  
 2896 shorter than the nucleus diameter; Class 2 - comet tail once or twice larger than the nu-  
 2897 cleus diameter; Class 3 - comet tail more than twice larger than the nucleus diameter;  
 2898 EEM - *E. macrophyllus* extract.

2899

2900

### 2901 3.5 Micronucleus test

2902 Table 3 shows the mean ± standard error of the frequency of micronuclei in the  
 2903 peripheral blood of mice. At time T1 (24 hours), all groups showed treated with *E.*  
 2904 *macrophyllus* showed statistically different micronucleus frequency compared to nega-  
 2905 tive control and positive control groups. However, the mean values of groups exposed  
 2906 to EEM at different doses were close to negative control group, with maximum differ-  
 2907 ence of 3.8. At times T2 (48 hours) and T3 (72 hours), exposure to EEM at different  
 2908 doses (500, 1000 and 2000 mg / kg) only showed significant differences compared to  
 2909 positive control. The positive control group (cyclophosphamide) at times T1, T2 and  
 2910 T3, as expected, showed a significant increase in the average number of cells with mi-  
 2911 cronuclei (p <0.05) compared to the other groups.

2912 These data demonstrate that exposure to EEM at the doses tested after the obser-  
 2913 vation period did not change the number of micronucleated polychromatic erythrocytes,  
 2914 concluding that EEM has no mutagenic activity.

2915

2916

2917

2918

2919 **Table 3:** Micronuclei frequency in 2000 cells / animal of Swiss mice orally treated with  
2920 *Echinodorus macrophyllus* extract.

GROUPS	24 h (T1)	48 h (T2)	72 h (T3)
Negative Control	5.8 ± 0.32 <sup>a</sup>	5.8 ± 0.41 <sup>a</sup>	5.9 ± 0.46 <sup>a</sup>
Positive Control	31.9 ± 0.91 <sup>c</sup>	30.4 ± 1.27 <sup>b</sup>	26.1 ± 1.76 <sup>b</sup>
500 mg/kg EEM	8.7 ± 0.86 <sup>b</sup>	7.7 ± 1.23 <sup>a</sup>	7.0 ± 0.87 <sup>a</sup>
1000 mg/kg EEM	9.6 ± 0.74 <sup>b</sup>	8.2 ± 0.59 <sup>a</sup>	8.6 ± 0.68 <sup>a</sup>
2000 mg/kg EEM	9.3 ± 0.47 <sup>b</sup>	8.9 ± 0.52 <sup>a</sup>	6.6 ± 0.54 <sup>a</sup>

2921

2922 Values expressed as mean±standard error; Different letters indicate statistically signifi-  
2923 cant difference (p <0.05; ANOVA / Tukey). EEM - *E. macrophyllus* extract.

2924

### 2925 3.6 Apoptosis

2926 The following groups: 500 mg / kg EEM, 1000 mg / kg EEM, 2000 mg / kg  
2927 EEM and negative control showed low frequency of apoptosis in liver and kidneys.  
2928 However, 1000 mg / kg EEM and 2000 mg / kg EEM groups were different from 500  
2929 mg / kg EEM and negative control groups in liver, while in kidney, only the group 2000  
2930 mg / kg EEM was different from the negative control. In the positive control (cyclo-  
2931 phosphamide), the frequency of apoptosis increased, with average of 57.4 ± 1.55 and  
2932 44.6 ± 2.50 times in liver and kidneys, respectively, being statistically different (p  
2933 <0.05) from negative control, 500 mg / kg EEM 1000 mg / kg EEM and 2000 mg / kg  
2934 EEM (table 4).

2935

2936 **Table 4:** Frequency of apoptotic cells in the liver and kidneys of Swiss mice after ad-  
2937 ministration of *Echinodorus microphyllus* extract.

Experimental Groups	Liver	Kidneys
Negative Control	20,2 ± 0,90 <sup>a</sup>	20,1 ± 0,78 <sup>a</sup>
Positive Control	57,4 ± 1,55 <sup>c</sup>	44,6 ± 2,50 <sup>c</sup>
500 mg/kg EEM	20,7 ± 1,39 <sup>a</sup>	22,8 ± 1,28 <sup>ab</sup>
1000 mg/kg EEM	32,5 ± 1,41 <sup>b</sup>	23,3 ± 0,98 <sup>ab</sup>
2000 mg/kg EEM	31,5 ± 1,61 <sup>b</sup>	26,4 ± 1,60 <sup>b</sup>

2938

2939 Values expressed as mean±standard error; Different letters indicate statistically signifi-  
2940 cant difference (p <0.05; ANOVA / Tukey). EEM - *E. macrophyllus* extract.

2941

#### 2942 4. DISCUSSION

2943 The HPLC results with regard to *E. macrophyllus* identified compounds of ul-  
2944 traviolet spectra spectra (UV) characteristic of flavonoids, corroborating the analysis of  
2945 standards proposed by Dourado (2008), where the identification of flavonoids showed  
2946 UV spectra similar to that found in our analysis. Flavonoids are widely found in fruits  
2947 and vegetables, with various pharmacological activities, which have the possibility of  
2948 inhibiting xanthine oxidase, have antioxidant, antibacterial and antiviral activities (Lin  
2949 et al., 2002), which justify the popular use of *E. macrophyllus* for various diseases and  
2950 with scientific evidence of its immunosuppressive (Pinto et al., 2007), anti-  
2951 inflammatory (Tanus-Rangel et al., 2010) and nephroprotective activities (Portella et al.  
2952 2012).

2953 There are few works in literature on its toxicity (Lopes et al., 2000) and system-  
2954 atic toxicological studies are necessary to establish criteria for selecting a safe dose (de  
2955 Melo et al., 2011), because only pharmacological studies are insufficient to validate the  
2956 effect of the plant compounds (Reyes-García, 2010).

2957 According to our results, the acute administration of *E. macrophyllus* led to no  
2958 mortality, weight loss or clinical signs of toxicity, even after 48 hours of exposure, sug-  
2959 gesting that the lethal dose (LD50) is higher than 2000 mg / kg body weight, and ac-  
2960 cording to OECD guidelines (2008), it can be classified as Class 5 (substance with  
2961 LD50 higher than 2000 mg / kg and less than 5000 mg / kg).

2962 Regarding biometric parameters, no change in body weight was observed, as  
2963 well as in the absolute and relative weights of organs (heart, lung, liver and kidneys). In  
2964 contrast, the spleen of animals from the positive control group showed reduced weight,  
2965 indicating organ hypoactivity, which was expected due to the adverse effects of cyclo-  
2966 phosphamide, being similar to results found by Navarro et al. (2014).

2967 The comet assay assesses genotoxicity, which detects DNA damage produced by  
2968 chemical and physical agents and ensures safety and reliability, since the sensitivity to  
2969 assess damage to individual cells is accurate and comparable to other methods that as-  
2970 sess damage in a population of cells (Fairbairn et al, 1995; Tice et al, 2000). In this  
2971 sense, the results of analysis using the comet assay of *E. macrophyllus* showed no  
2972 genotoxic activity, indicating no DNA damage in the tested doses, results similar to  
2973 those obtained by Lopes et al. (2000), who studied the toxicological and genotoxic ef-  
2974 fects of *E. macrophyllus* using the aqueous extract of leaves in *in vitro* assays of  
2975 hepatoma cells and renal epithelial cells, and the extract showed no cytotoxicity. After 6

2976 weeks of continuous administration of lyophilized extract with respective doses of 3,  
2977 23, 297mg / kg and with crude extract (2200 mg / kg), SWISS mice showed no  
2978 genotoxic effects on liver, kidneys and blood cells, indicating that the dose for human  
2979 consumption was 23 mg / kg. Corroborating our results, it was demonstrated that at  
2980 doses of up to 2000 mg / kg body weight, *E. macrophyllus* showed no genotoxic or mu-  
2981 tagenic effects.

2982         The micronucleus test is an important *in vitro* and *in vivo* biomarker widely used  
2983 in molecular epidemiology to assess cytogenetic damage in populations exposed to  
2984 genotoxic agents (Bonassi et al., 2007, Samanta and Dey, 2012), evaluating the muta-  
2985 genicity of any chemicals (Morita et al., 1997) using cells from rodents and fish (*in vi-*  
2986 *vo*) as well as various cell types (*in vitro*). Since plant extracts can induce the formation  
2987 of micronuclei during cell division through the clastogenic (result of chromosome frag-  
2988 ments obtained by breaks) or aneugenic action (results of whole chromosomes lost dur-  
2989 ing the process of cell division) (Salamone et al. 1980), the micronucleus test is often  
2990 used to quantitatively assess exposure to chemical or physical agents, being an im-  
2991 portant methodology recommended by research institutes in the toxicological genetics  
2992 area for the evaluation of a compound and its relationship in the development and / or  
2993 stimulating cancer activity (Krishna and Hayashi, 2000).

2994         In the micronucleus test in the peripheral blood of *E. macrophyllus*, at T1, 500  
2995 mg / kg EEM, 1000 mg / kg EEM and 2000 mg / kg EEM groups showed averages of  
2996 micronuclei frequency significantly higher compared to the negative control group.  
2997 However, these statistical differences between negative control and experimental groups  
2998 were small and did not indicate mutagenicity. It was also observed that there was no  
2999 dose-dependent relationship and increased frequency of micronuclei, as group 1000 mg  
3000 / kg group EEM obtained higher average micronucleus compared to group 2000 mg / kg  
3001 EEM. In addition, Navarro et al. (2014) assessed the mutagenic activity of synthetic  
3002 lipid 3-heptyl-3,4,6-trimethoxy-3H-isobenzofuran at doses of 10, 20 and 40 mg, and  
3003 along with negative control group, had average micronucleus values greater than those  
3004 found in 500 mg / kg EEM, 1000 mg / kg EEM and 2000 mg / kg EEM groups at T1 in  
3005 our study, and were not considered mutagenic. The same was observed in the work of  
3006 Oliveira et al. (2009), where glutamine at dose of 600 mg / kg also showed higher aver-  
3007 age micronucleus value, being classified as non-mutagenic, both studies were performed  
3008 with the same methodology of this study, which strengthens our results, demonstrating  
3009 that EEM has no mutagenicity, despite the statistical difference.



3010 At times T2 and T3, micronucleus frequencies decreased in all groups treated  
3011 with *E. macrophyllus* extract, being similar to the negative control.

3012 The experimental groups showed no apoptosis events, since no DNA damage or  
3013 micronuclei frequency were observed, which confirms the lack of apoptotic events, be-  
3014 ing similar to the negative control group. However, the positive control group (cyclo-  
3015 phosphamide) caused an increase in the micronuclei frequency, despite the decreasing  
3016 trend throughout the experiment, indicating spleen hypoactivity after cyclophosphamide  
3017 administration. Furthermore, increased apoptosis frequency was also observed in liver  
3018 and kidney. In this case, the results of the negative control group were similar to those  
3019 obtained by Navarro et al (2014), who also evaluated the apoptotic effects of cyclo-  
3020 phosphamide.

3021 Therefore, EEM did not increase the incidence of comets and did not increase  
3022 the number of micronucleated polychromatic erythrocytes at the end of the analysis,  
3023 showing that EEM was not genotoxic, mutagenic or apoptotic after observations with  
3024 the doses tested.

3025

## 3026 **5. CONCLUSION**

3027 It was concluded that EEM showed no acute toxicity after exposure and that its  
3028 LD50 is greater than 2000 mg / kg with no genotoxicity, mutagenicity and frequency of  
3029 apoptotic cells at doses of 500, 1000 and 2000 mg / kg body weight.

3030

## 3031 **Acknowledgments**

3032 The authors thank CAPES for the financial assistance.

3033

## 3034 **Conflict of interest**

3035 The authors declare that there are no conflicts of interest.

3036 **6. REFERENCES**

3037

3038 Bonassi S, Znaor A, Ceppi M, Lando C, Chang WP, Holland N, Kirsch-Volders M, Zeiger  
3039 E, Ban S, Barali R, Bigatti MP, Bolognesi C, Cebulska-Wasilewska A, Fabianova E, Fucic  
3040 A, Hagmar L, Joksic G, Martelli A, Migliore L, Mirkova E, Scarfi MR, Zijno A, Norppa  
3041 H, Fenech M., 2007. An increased micronucleus frequency in peripheral blood  
3042 lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis*. 28:625-31.

3043

3044 Brazilian Health Surveillance Agency (ANVISA). 2004. Resolution RE-90 Guide for con-  
3045 ducting pre-clinical studies of herbal toxicity.

3046

3047 Brusick DJ., 1987. Genetic risk assessment. *JAPCA*. 37(7):795.

3048

3049 Buznego, M. T., Pérez-Saad, H., 2006. Behavioral and antiepileptic effect of acute  
3050 administration of the extract of the aquatic plant *Echinodorus berteroi* (Sprengel) Fassett  
3051 (upright burhead). *Epilepsy Behav.* 9:40-5.

3052

3053 Coimbra R. 1994. *Manual de fitoterapia*. Belém: Editora CEJUP.

3054

3055 Costa LL, Albano F, Augusto GTL, Marque LA, Fernando LMS, Poubel GS, Magalhães  
3056 IA, Firmino JN, Felzenszwalb I, Kovary K., 2000. Toxicological evaluation by in vitro and  
3057 in vivo assays of an aqueous extract prepared from *Echinodorus macrophyllus* leaves.  
3058 *Toxicol Lett.* 116: 189-98.

3059

3060 Melo, JG., Santos AG, Nascimento SC, Amorim EL, e Albuquerque P., 2011. Medicinal  
3061 plants used as antitumor agents in Brazil: an ethnobotanical approach. *Evid Based*  
3062 *Complement Alternat Med.* 36:53-9.

3063

3064 Dourado RS e Ladeira ÂM., 2008. Identificação de flavonóides em *Hypericum cordatum*  
3065 (Vell.) N. Robson (Clusiaceae). *Revista Brasil. Bot.* 31(4):611-20.

3066

3067 Fairbairn, DW, Olive PL, O'Neal KL., 1995. The comet assay: a comprehensive review.  
3068 *Mutat Res.* 339:37-59.

3069

3070 Fenech M, Holland N, Chang WP, Zeiger E, Bonassi S., 1999. The Human micronucleus  
3071 project-An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for  
3072 measuring DNA damage in humans. *Mutat Res.* 428: 271-83.

3073

3074 Hayashi M, Morita T, Kodama Y, Sofuni T, Ishidate M., 1990. The micronucleus assay  
3075 with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutat Res.*  
3076 245:245-9.

3077

3078 Kobayashi J, Sekiguchi M, Shimamoto S, Shigemori H, Ohsaki A., 2000. Echinophyllins  
3079 C-F, new nitrogen-containing clerodane diterpenoids from *Echinodorus macrophyllus*. *J*  
3080 *Nat Prod.* 63:1576-9.

3081

3082 Krishna G, Hayashi M., 2000. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and  
3083 data interpretation. *Mutat Res.* 455:155-66.

- 3084  
3085 Leite JPV, Pimenta DS, Gomes RSDL, Dantas-Barros AM., 2007. Contribuição ao estudo  
3086 farmacobotânico da *Echinodorus macrophyllus* (Kunth) Micheli (chapéu-de-couro) -  
3087 Alismataceae. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 17(2):242-248.,  
3088
- 3089 Lin CM, Chen CS, Chen CT, Liang YC, Lin Jk., 2002. Molecular modeling of flavonoids  
3090 that inhibits xanthine oxidase. *Biochem Biophys Res Commun*. 294:167-72.  
3091
- 3092 Litchfield JT, Wilcoxonf., 1949. A simplified method of evaluating dose-effect  
3093 experiments. *J Pharmacol Exp Ther*. 96:99-113.  
3094
- 3095 Lopes LC, Albano F, Laranja GAT, Alves LM, Silva LFM, Souza GP, Araujo IM, Nogueira JF., 2000.  
3096 Toxicological evaluation by in vitro and in vivo assays of aqueous extract prepared from  
3097 *Echinodorus macrophyllus* leaves. *Toxicology letters*. 116: 189-198.  
3098
- 3099 Malone MH, Robichaud RC., 1962. A Hippocratic screen for pure or crude drug materials.  
3100 *Lordya*. 25:320-31.  
3101
- 3102 Martins ER, Castro DM, Castellani DC, Dias JE, 2000. *Plantas medicinais*. Viçosa:  
3103 Editora UFV.  
3104
- 3105 Mauro MO, Satori D, Oliveira RJ, Ishii PL, Mantovani MS, Ribeiro LR., 2011. Activity of  
3106 selenium on cell proliferation, cytotoxicity, and apoptosis and on the expression of CASP9,  
3107 BCL-XL and APC in intestinal adenocarcinoma cells. *Mutat Res*. 715:7-12.  
3108
- 3109 Morita T, Asano N, Awogi T, Sazaki YF, Sato S, Shimada H, Sutou S, Suzuki T, Wakata  
3110 A, Sofuni T, Hayashi M., 1997. Evaluation of the rodent micronucleus assay in the  
3111 screening of IARC carcinogens (groups 1, 2A and 2B) the summary report of the 6th  
3112 collaborative study by CSGMT/JEMS MMS. Collaborative Study of the Micronucleus  
3113 Group Test. *Mammalian Mutagenicity Study Group*. *Mutat Res*. 38:259-67.  
3114
- 3115 Nascimento EL, Watanabe M, Fonseca CD, Schlottfeldt FS, Vattimo MFF., 2014. Renoprotective ef-  
3116 fect of the *Echinodorus macrophyllus* in induced renal injury. *Enferm*. 27(1):12-7.  
3117
- 3118 Navarro SD, Beatriz A, Meza A, Pesarini JR, Gomes RS, Karaziack CB, Cunha-Laura AL,  
3119 Monreal AC, Romão W, Lacerda Júnior V, Mauro MO, Oliveira RJ., 2014. A new  
3120 synthetic resorcinolic lipid 3-heptyl-3,4,6-trimethoxy-3H-isobenzofuran-1-one: evaluation  
3121 of toxicology and ability to potentiate the mutagenic and apoptotic effects of  
3122 cyclophosphamide. *Eur J Med Chem*. 75: 132-42.  
3123
- 3124 Oliveira RJ, Baise E, Mauro MO, Pesarini JR, Matuo R, Silva AF, Ribeiro LR, Mantovani  
3125 MS., 2009. Evaluation of chemopreventive activity of glutamine by the comet and the  
3126 micronucleus assay in mice's peripheral blood. *Environ Toxicol Pharmacol*. 28:120-4.  
3127
- 3128 Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), 2008. Guidelines for  
3129 Testing of Chemical, Guideline 425. Acute Oral Toxicity-Up-and-down-procedure (UDP),  
3130 Paris.  
3131

- 3132 Pinto AC, Rego GC, Siqueira AM, Cardoso CC, Reis PA, Marques EA, Coelho MG,  
3133 Carvalho Sabino KC., 2007. Immunosuppressive effects of *Echinodorus macrophyllus*  
3134 aqueous extract. *J Ethnopharmacol.* 111:435-9.  
3135
- 3136 Portella VG, Cosenza GP, Diniz LR, Pacheco LF, Cassali GD, Caliari MV, Brandão M,  
3137 Vieira MA., 2012. Nephroprotective Effect of *Echinodorus macrophyllus* Micheli on  
3138 Gentamicin-Induced Nephrotoxicity in Rats. *Nephron Extra.* 2:177-83.  
3139
- 3140 Rates SMK., 2001. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de Far-  
3141 macognosia. *Rev Bras Farmacogn.* 11:57-69.  
3142
- 3143 Reyes-García V., 2010. The relevance of traditional knowledge systems for  
3144 ethnopharmacological research: theoretical and methodological contributions. *J Ethnobiol*  
3145 *Ethnomed.* 6:32.  
3146
- 3147 Ribeiro LR, Salvadori DMF, Marques EK, 2003. *Mutagênese Ambiental.* Ed. ULBRA,  
3148 Canoas/RS.  
3149
- 3150 Rovozzo GC, Burke CN, 1973. *A Manual of Basic Virological Techniques.* Prentice Hall, New Jersey.  
3151
- 3152 Salamone M, Heddle J, Stuart E, Katz M., 1980. Towards an improved micronucleus test:  
3153 studies on 3 model agents, mitomycin C, cyclophosphamide and dimethylbenzanthracene.  
3154 *Mutat Res.* 74:347-56.  
3155
- 3156 Samanta S, Dey P., 2012. Micronucleus and its applications. *Diagn Cytopathol.* 40:84-90.  
3157
- 3158 Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL., 1988. A simple technique for quantitation  
3159 of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 175:184-91.  
3160
- 3161 Tanus-Rangel E, Santos SR, Lima JC, Lopes L, Noldin V, Monache FD, Sechinel-Filho V,  
3162 Martins DT., 2010. Topical and systemic anti-inflammatory effects of *Echinodorus*  
3163 *macrophyllus* (Kunth) Micheli (Alismataceae). *J Med Food.* 13:1161-6.  
3164
- 3165 Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y,  
3166 Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and  
3167 in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen.* 35:206-21.  
3168
- 3169 Tice RR, Strauss GH., 1995. The single cell gel electrophoresis/comet assay: a potential  
3170 tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans. *Stem Cells.* 13 Suppl 1:207-  
3171 14.  
3172  
3173  
3174  
3175



- 3176  
3177  
3178  
3179
1. [Browse journals](#)
  2. [Regulatory Toxicology and Pharmacology](#)
  3. [Guide for authors](#)

### 3180 **Guide for Authors**

3181 **Your Paper Your Way** - We now differentiate between the requirements for new and  
3182 revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF  
3183 file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will  
3184 you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the  
3185 items required for the publication of your article.  
3186 **To find out more, please visit the Preparation section below.**



### **Introduction**

3187 *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, the Official  
3188 Journal of the [International Society for Regulatory Toxicology and Pharmacology](#), matches  
3189 reports in toxicology, pharmacology, epidemiology, and allied sciences, with reports on  
3190 philosophical, legislative, legal, and public opinion issues that define public health, safety,  
3191 and environmental regulations. International in scope, the journal speaks at all levels of  
3192 science and policy to the community of research and development scientists, to business  
3193 and legal decision makers, and to regulatory officials and legislative operators worldwide.

### 3194 **Types of paper**

3195 ***Ethical Treatment of Subjects.*** Submission of a manuscript implies that the authors war-  
3196 rant to have complied with institutional policies governing the ethical treatment of human  
3197 subjects and animals, and that the authors are ready to share the original approval docu-  
3198 ments if so requested.

3199 ***Peer Review.*** Submitted manuscripts not rejected at first screen will undergo a peer review  
3200 process that occasionally could require substantial revision and may last several months,  
3201 depending on the timeliness of author response.

3202 ***Letters.*** A brief one-printed-page observation may be published under a "Letters" heading  
3203 with the understanding that only one reply will be published in a rebuttal. A manuscript  
3204 intended for publication in Letters or a rebuttal should be so designated when submitted for  
3205 publication.



### **Before You Begin**

3206  
3207 **Ethics in publishing** - Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethi-  
3208 cal guidelines for journal publication](#).

3209 **Conflict of interest** - *Regulatory Toxicology and Pharmacology* follows the ICMJE rec-  
3210 ommendations regarding conflict of interest disclosures. All authors are required to report  
3211 the following information with each submission:

- 3212  
3213  
3214
1. All third-party financial support for the work in the submitted manuscript.
  2. All financial relationships with any entities that could be viewed as relevant to the general area of the submitted manuscript.

- 3215 3. All sources of revenue with relevance to the submitted work who made payments  
 3216 to you, or to your institution on your behalf, in the 36 months prior to submission.  
 3217 4. Any other interactions with the sponsor of outside of the submitted work should al-  
 3218 so be reported.  
 3219 5. Any relevant patents or copyrights (planned, pending, or issued).  
 3220 6. Any other relationships or affiliations that may be perceived by readers to have in-  
 3221 fluenced, or give the appearance of potentially influencing, what you wrote in the  
 3222 submitted work.

3223 As a general guideline, it is usually better to disclose a relationship than not. This infor-  
 3224 mation will be acknowledged at publication in a Transparency Document. Additional in-  
 3225 formation on the ICMJE recommendations can be found at: <http://www.icmje.org>. The  
 3226 form for conflict of interest disclosure can be downloaded [here](#), or at  
 3227 [http://www.icmje.org/coi\\_disclosure.pdf](http://www.icmje.org/coi_disclosure.pdf) (if this link does not display properly in your  
 3228 browser, please right-click the link and select "Save Target As..." or "Save Link as..." from  
 3229 the popup menu.)

3230 **Submission declaration and verification** - Submission of an article implies that the work  
 3231 described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of  
 3232 a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see  
 3233 <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication  
 3234 elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the  
 3235 responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be  
 3236 published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including elec-  
 3237 tronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your  
 3238 article may be checked by the originality detection service CrossCheck  
 3239 <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

3240 Written authorization by personal sources may be required at the Editor's discretion. Arti-  
 3241 cles and any other material published in *Regulatory Toxicology and Pharmacology* repre-  
 3242 sent the opinions of the authors, unless directly endorsed or authorized, should not be con-  
 3243 strued to reflect the opinions of the International Society of Regulatory Toxicology and  
 3244 Pharmacology, the Editors, or the Publisher. Original papers only will be considered.

3245 **Changes to authorship** - Authors are expected to consider carefully the list and order of  
 3246 authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the  
 3247 time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names  
 3248 in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and  
 3249 only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive  
 3250 the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list  
 3251 and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addi-  
 3252 tion, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes  
 3253 confirmation from the author being added or removed. Only in exceptional circumstances  
 3254 will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manu-  
 3255 script has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manu-  
 3256 script will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue,  
 3257 any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

3258 **Article transfer service** - This journal is part of our Article Transfer Service. This means  
 3259 that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating jour-  
 3260 nals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you  
 3261 agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to refor-  
 3262 mat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. [More infor-](#)  
 3263 [mation](#).

3264 **Copyright** - Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal  
 3265 Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corre-  
 3266 sponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing  
 3267 Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

3268 Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts  
 3269 for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for  
 3270 resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including  
 3271 compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the  
 3272 author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the  
 3273 source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

3274 For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete  
 3275 an 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of open  
 3276 access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

3277 **Author rights**- As an author you (or your employer or institution) have certain rights to  
 3278 reuse your work. [More information](#).

3279 **Elsevier supports responsible sharing** - Find out how you can [share your research](#) pub-  
 3280 lished in Elsevier journals.

3281 **Role of the funding source** - You are requested to identify who provided financial support  
 3282 for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the  
 3283 role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation  
 3284 of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication.  
 3285 If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

3286 **Funding body agreements and policies** - Elsevier has established a number of agreements  
 3287 with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access poli-  
 3288 cies. Some funding bodies will reimburse the author for the Open Access Publication Fee.  
 3289 Details of [existing agreements](#) are available online.

3290 **US National Institutes of Health (NIH) voluntary posting ("Public Access") policy.**  
 3291 Elsevier facilitates author response to the NIH voluntary posting request (referred to as the  
 3292 NIH "Public Access Policy"; see <http://www.nih.gov/about/publicaccess/index.htm>) by  
 3293 posting the peer-reviewed author's manuscript directly to PubMed Central on request from  
 3294 the author, 12 months after formal publication. Upon notification from Elsevier of ac-  
 3295 ceptance, we will ask you to confirm via e-mail (by e-mailing us at  
 3296 [NIHauthorrequest@elsevier.com](mailto:NIHauthorrequest@elsevier.com)) that your work has received NIH funding and that you  
 3297 intend to respond to the NIH policy request, along with your NIH award number to facili-  
 3298 tate processing. Upon such confirmation, Elsevier will submit to PubMed Central on your  
 3299 behalf a version of your manuscript that will include peer-review comments, for posting 12  
 3300 months after formal publication. This will ensure that you will have responded fully to the  
 3301 NIH request policy. There will be no need for you to post your manuscript directly with  
 3302 PubMed Central, and any such posting is prohibited.

3303 **Open access** - This journal offers authors a choice in publishing their research:

3304 **Open access**

- 3305 • Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted re-  
 3306 use.
- 3307 • An open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their re-  
 3308 search funder or institution.

3309 **Subscription** -• Articles are made available to subscribers as well as developing countries  
 3310 and patient groups through our [universal access programs](#).

- 3311 • No open access publication fee payable by authors.

3312 Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer  
3313 review criteria and acceptance standards.

3314 For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following [Creative  
3315 Commons user licenses](#):

3316 ***Creative Commons Attribution (CC BY)*** - Lets others distribute and copy the article, cre-  
3317 ate extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or  
3318 from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology),  
3319 text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the au-  
3320 thor(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not  
3321 modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

3322 ***Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)*** - For non-  
3323 commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collec-  
3324 tive work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do  
3325 not alter or modify the article.

3326 The open access publication fee for this journal is **USD 2600**, excluding taxes. Learn more  
3327 about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

3328 ***Green open access*** - Authors can share their research in a variety of different ways and  
3329 Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see  
3330 our [green open access page](#) for further information. Authors can also self-archive their  
3331 manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after  
3332 an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which  
3333 typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review  
3334 and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appro-  
3335 priate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers be-  
3336 fore an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it  
3337 begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable  
3338 form.

3339 This journal has an embargo period of 12 months.

3340 ***Elsevier Publishing Campus*** - The Elsevier Publishing Campus  
3341 ([www.publishingcampus.com](http://www.publishingcampus.com)) is an online platform offering free lectures, interactive  
3342 training and professional advice to support you in publishing your research. The College of  
3343 Skills training offers modules on how to prepare, write and structure your article and ex-  
3344 plains how editors will look at your paper when it is submitted for publication. Use these  
3345 resources, and more, to ensure that your submission will be the best that you can make it.

3346 ***Language (usage and editing services)*** - Please write your text in good English (American  
3347 or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English  
3348 language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling  
3349 errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language  
3350 Editing service](#) available from Elsevier's WebShop.

3351 **Submission** - Our online submission system guides you stepwise through the process of  
3352 entering your article details and uploading your files. The system converts your article files  
3353 to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are  
3354 required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notifi-  
3355 cation of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

3356 Contact information:

3357 Regulatory Toxicology and Pharmacology

3358 Editorial Office

3359 525 B Street, Suite 1900

3360 San Diego, CA 92101-4495, USA



3361 Telephone: (619) 699-6275

3362 Fax: (619) 699-6211

3363 E-mail: [rtp@elsevier.com](mailto:rtp@elsevier.com)

3364 **Experimental procedures** - All animal experiments reported in submitted manuscripts  
3365 should be carried out in accordance with the official guidelines for experimental animal  
3366 treatment and reporting, as current in the countries where a reporting manuscript originat-  
3367 ed. Examples of these guidelines are the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986  
3368 and associated guidelines, the European Communities Council Directive of 24 November  
3369 1986 (86/609/EEC) or the National Institutes of Health guide for the care and use of La-  
3370 boratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978). Authors should detail in the  
3371 manuscript how such guidelines have been followed.

3372 **Referees** - Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential  
3373 referees. For more details, visit our [Support site](#). Note that the editor retains the sole right  
3374 to decide whether or not the suggested reviewers are used.



### Preparation

3375

3376 **NEW SUBMISSIONS** - Submission to this journal proceeds totally online and you will be  
3377 guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically  
3378 converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.  
3379 As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript  
3380 as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word doc-  
3381 ument, in any format or lay-out that can be used by referees to evaluate your manuscript. It  
3382 should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may  
3383 still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that indi-  
3384 vidual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

3385 **References** - There are no strict requirements on reference formatting at submission. Ref-  
3386 erences can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable,  
3387 author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, vol-  
3388 ume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly en-  
3389 couraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by  
3390 Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the  
3391 author to correct.

3392 **Formatting requirements** - There are no strict formatting requirements but all manuscripts  
3393 must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Ab-  
3394 stract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and  
3395 Tables with Captions.

3396 If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be  
3397 included in your initial submission for peer review purposes.  
3398 Divide the article into clearly defined sections.

3399 Please ensure the text of your paper is double-spaced and has consecutive line numbering-  
3400 this is an essential peer review requirement.

3401 **Figures and tables embedded in text** - Please ensure the figures and the tables included in  
3402 the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bot-  
3403 tom or the top of the file.

### REVISED SUBMISSIONS

3405 **Use of word processing software** - Regardless of the file format of the original submission,  
3406 at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of  
3407 the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on pro-  
3408 cessing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of

3409 conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). See also the  
3410 section on Electronic artwork.

3411 To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and  
3412 'grammar-check' functions of your word processor.

3413 **Article Structure - Preparation of Manuscript.** - Authors of scientific reports should  
3414 make a point to validate whether the data measure what they claim to have measured or  
3415 whether they could be distorted by adventitious interferences. Authors should also provide  
3416 evidence that test and control conditions differ only on account of the experimental varia-  
3417 bles tested, or are not affected by spurious confounding conditions. Conclusions should  
3418 focus on the most probable explanation of results, but should also endeavor to point out  
3419 other less apparent but plausible conclusions. Submissions that are not scientific experi-  
3420 mental reports, such as policy positions and reviews, should strive for range, logical se-  
3421 quence, clarity, and well-articulated conclusions.

3422 The popularity of *Regulatory Toxicology and Pharmacology* makes it necessary to severe-  
3423 ly limit authors' discussions and data presentations in their manuscripts. Because the scope  
3424 of environmental toxicology and pharmacology is so great, it is not possible to devote  
3425 many pages to a single issue.

3426 Use generic names of chemicals whenever possible. Proprietary names and trademarks  
3427 should appear only to identify the source of the chemical, and subsequently only the gener-  
3428 ic name should be used. All abbreviations, other than those for standard units, should be  
3429 defined in text or in a footnote. Abbreviations should be unpunctuated.

3430 Manuscripts should be double-spaced and use continuous line numbering throughout the  
3431 body of your manuscript only. Pages should be numbered consecutively and organized as  
3432 follows:

3433 The title page (p. 1) should contain the article title, authors' names and complete affilia-  
3434 tions, footnotes to the title, and the address for manuscript correspondence (including e-  
3435 mail address and telephone and fax numbers). Separate word counts should be provided for  
3436 abstract, text, and references. A second page containing only the title of the paper should  
3437 be submitted if the authors wish to obtain a blind peer review.

3438 The abstract (p. 2) must be a single paragraph that summarizes the main findings of the  
3439 paper in less than 200 words. After the abstract a list of up to 10 keywords that will be use-  
3440 ful for indexing or searching should be included.

3441 Format. Flexibility of format is allowed, given the mix of multidisciplinary scientific re-  
3442 ports and of policy and review articles of interest to the journal. Clarity and brevity will be  
3443 preferred.

3444 **Subdivision - numbered sections** - Divide your article into clearly defined and numbered  
3445 sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract  
3446 is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-  
3447 referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading.  
3448 Each heading should appear on its own separate line.

3449 **Introduction** - State the objectives of the work and provide an adequate background,  
3450 avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

3451 **Material and methods** - Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced.  
3452 Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications  
3453 should be described.

3454 **Theory/calculation** - A Theory section should extend, not repeat, the background to the  
3455 article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In  
3456 contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

3457 **Results** - Results should be clear and concise.

3458 **Discussion** - This should explore the significance of the results of the work, not repeat  
 3459 them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive  
 3460 citations and discussion of published literature.

3461 **Conclusions** - The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions  
 3462 section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Dis-  
 3463 cussion section.

3464 **Appendices** - If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc.  
 3465 Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq.  
 3466 (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures:  
 3467 Table A.1; Fig. A.1, etc.

#### 3468 **Essential title page information**

3469 • **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems.  
 3470 Avoid abbreviations and formulae where possible.

3471 • **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family  
 3472 name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors'  
 3473 affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affili-  
 3474 ations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front  
 3475 of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the  
 3476 country name and, if available, the e-mail address of each author.

3477 • **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of  
 3478 refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given  
 3479 and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**

3480 • **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the arti-  
 3481 cle was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may  
 3482 be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually  
 3483 did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals  
 3484 are used for such footnotes.

3485 **Abstract** - A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the  
 3486 purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often  
 3487 presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason,  
 3488 References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also,  
 3489 non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be  
 3490 defined at their first mention in the abstract itself.

3491 The abstract should be fewer than 200 words.

3492 **Graphical abstract** - Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it  
 3493 draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the  
 3494 contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a  
 3495 wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online  
 3496 submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328  
 3497 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm  
 3498 using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS  
 3499 Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.  
 3500 Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best  
 3501 presentation of their images and in accordance with all technical requirements: [Illustration  
 3502 Service](#).

3503 **Highlights** - Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of  
 3504 bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a sepa-  
 3505 rate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and in-

3506 clude 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, or, maximum 20  
3507 words per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

3508 **Keywords** - Provide up to 10 keywords.

3509 **Abbreviations** - Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be  
3510 placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the ab-  
3511 stract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure con-  
3512 sistency of abbreviations throughout the article.

3513 **Acknowledgements** - Collate acknowledgements in a separate section at the end of the  
3514 article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a foot-  
3515 note to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the re-  
3516 search (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

3517 **Formatting of funding sources** - List funding sources in this standard way to facilitate  
3518 compliance to funder's requirements:

3519 Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers  
3520 xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and  
3521 the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

3522 It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and  
3523 awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university,  
3524 college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that  
3525 provided the funding.

3526 If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

3527 This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, com-  
3528 mercial, or not-for-profit sectors.

3529 **Footnotes** - Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout  
3530 the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be  
3531 used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present  
3532 the footnotes themselves separately at the end of the article.

### 3533 **Artwork**

#### 3534 **Electronic artwork**

##### 3535 *General points*

- 3536 • Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- 3537 • Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- 3538 • Number the illustrations according to their sequence in the text.
- 3539 • Use a logical naming convention for your artwork files.
- 3540 • Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- 3541 • For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables  
3542 within a single file at the revision stage.
- 3543 • Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate  
3544 source files.

3545 A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

3546 **You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given  
3547 here.**

3548 **Formats** - Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized,  
3549 please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution  
3550 requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):  
3551 EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'. TIFF (or  
3552 JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi. TIFF  
3553 (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi. TIFF (or JPG): Combina-

3554 tions bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

3555 **Please do not:**

3556 • Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolu-  
3557 tion is too low.

3558 • Supply files that are too low in resolution.

3559 • Submit graphics that are disproportionately large for the content.

3560 **Color artwork** - Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or  
3561 JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with  
3562 your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no addi-  
3563 tional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other  
3564 sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed  
3565 version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the  
3566 costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your prefer-  
3567 ence for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic  
3568 artwork.](#)

3569 **Figure captions** - Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a  
3570 brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the  
3571 illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

3572 **Tables** - Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed ei-  
3573 ther next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables  
3574 consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes  
3575 below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in  
3576 them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical  
3577 rules.

3578 **References** - References should be cited in the text by the first author's surname followed  
3579 by et al. If only two authors are listed, both names should be cited. References should be  
3580 listed alphabetically by name. Journal names should follow the style of the latest edition of  
3581 the Chemical Abstracts Service Source Index. Only articles that have been published or are  
3582 in press should be included in the references. Unpublished results or personal communica-  
3583 tions should be cited as such in the text.

3584 Gerrity, T.R., Henry, C.J., 1990. Principles of Route-to-Route Extrapolation for Risk As-  
3585 sessment. Elsevier, New York.

3586 LaPuma, P.T., Brain S. Rhodes, B.S., 2002. Chromate content versus particle size for air-  
3587 craft paints. Regul. Toxicol. Pharmacol. 36, 318-324.

3588 Mettam, O.R., Adams, L.B., 1999. How to prepare an electronic version of your article, in:  
3589 Jones, B.B., Smith, R.Z. (Eds.), Introduction to the Electronic Age. E-Publishing Inc., New  
3590 York, pp. 281-304.

3591 **Citation in text** - Please ensure that every reference cited in the text is also present in the  
3592 reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full.  
3593 Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference  
3594 list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list  
3595 they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitu-  
3596 tion of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'.  
3597 Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

3598 **Reference**

*links*

3599 Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online  
3600 links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing  
3601 services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the  
3602 references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication

3603 year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful  
3604 as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

3605 A DOI can be used to cite and link to electronic articles where an article is in-press and full  
3606 citation details are not yet known, but the article is available online. A DOI is guaranteed  
3607 never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example  
3608 of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M.,  
3609 James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles  
3610 slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*,  
3611 <http://dx.doi.org/10.1029/2001JB000884i>. Please note the format of such citations should  
3612 be in the same style as all other references in the paper.

3613 **Web references** - As a minimum, the full URL should be given and the date when the ref-  
3614 erence was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates,  
3615 reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed  
3616 separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be in-  
3617 cluded in the reference list.

3618 **References in a special issue** - Please ensure that the words 'this issue' are added to any  
3619 references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Is-  
3620 sue.

3621 **Reference management software** - Most Elsevier journals have their reference template  
3622 available in many of the most popular reference management software products. These  
3623 include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#) and  
3624 [Zotero](#), as well as [EndNote](#). Using the word processor plug-ins from these products, au-  
3625 thors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after  
3626 which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If  
3627 no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample refer-  
3628 ences and citations as shown in this Guide. Users of Mendeley Desktop can easily install  
3629 the reference style for this journal by clicking the following link:  
3630 <http://open.mendeley.com/use-citation-style/regulatory-toxicology-and-pharmacology>

3631 When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the  
3632 Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

3633 **Reference formatting** - There are no strict requirements on reference formatting at submis-  
3634 sion. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where ap-  
3635 plicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publi-  
3636 cation, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is  
3637 highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted  
3638 article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof  
3639 stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should  
3640 be arranged according to the following examples:

3641 **Reference style** - *Text:* All citations in the text should refer to:  
3642 1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year  
3643 of publication;  
3644 2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;  
3645 3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publica-  
3646 tion.

3647 Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed  
3648 first alphabetically, then chronologically.

3649 Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer  
3650 et al. (2010) have recently shown ...'

3651 *List:* References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologi-  
 3652 cally if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must  
 3653 be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

3654 *Examples:*

3655 Reference to a journal publication:

3656 Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific arti-  
 3657 cle. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

3658 Reference to a book:

3659 Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

3660 Reference to a chapter in an edited book:

3661 Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in:  
 3662 Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc.,  
 3663 New York, pp. 281–304.

3664 Reference to a website:

3665 Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK.  
 3666 <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed  
 3667 13.03.03).

3668 **Journal abbreviations source** - Journal names should be abbreviated according to the [List](#)  
 3669 [of Title Word Abbreviations](#).

3670 **Submission checklist** - The following list will be useful during the final checking of an  
 3671 article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors  
 3672 for further details of any item.

3673 **Ensure that the following items are present:**

3674 One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- 3675 • E-mail address
- 3676 • Full postal address

3677 All necessary files have been uploaded, and contain:

- 3678 • Keywords
- 3679 • All figure captions
- 3680 • All tables (including title, description, footnotes)

3681 Further considerations

- 3682 • Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- 3683 • All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- 3684 • Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (includ-  
 3685 ing the Internet)

3686 Printed version of figures (if applicable) in color or black-and-white

- 3687 • Indicate clearly whether or not color or black-and-white in print is required.

3688 For any further information please visit our [Support Center](#).



### After Acceptance

3689 **Online proof correction** - Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our  
 3690 online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environ-  
 3691 ment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on fig-  
 3692 ures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a  
 3693 faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, elimi-  
 3694 nating the potential introduction of errors.

3695 If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All  
 3696 instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alterna-  
 3697 tive methods to the online version and PDF.  
 3698

3699 We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please  
3700 use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of  
3701 the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication  
3702 will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to  
3703 ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully  
3704 before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proof-  
3705 reading is solely your responsibility.

3706 **Offprints** - The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#)  
3707 providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#).  
3708 The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, includ-  
3709 ing email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the off-  
3710 print order form which is sent once the article is accepted for publication. Both correspond-  
3711 ing and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Webshop](#). Corresponding  
3712 authors who have published their article open access do not receive a Share Link as their  
3713 final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be  
3714 shared through the article DOI link.

3715

3716



3717 **5.3 Valores de referência para parâmetros bioquímicos em ratos**

3718

3719 Parâmetros bioquímicos séricos de ratos machos Wistar adultos encontrados em outros  
3720 estudos.

Parâmetros (unid.)	Dantas <i>et al</i> (2006)	Centro de Bioterismo da FMUSP (2008)	Laboratório Charles Ri- ver (2008)	Melo <i>et al.</i> (2012)
AST (U/L)	81 ± 11,7	129,0 – 148,1	18 – 45	131,7 ± 23,09
ALT (U/L)	51 ± 12,3	114,0 – 290,8	74 – 143	48,4 ± 6,46
Colesterol (mg/dL)	87 ± 18,1	98,9 – 110,1	37 – 85	67,4 ± 8,72
Triglicerídeos (mg/dL)	82 ± 24,7	110 – 174,8	20 – 114	89,9 ± 29,16
Creatinina (mg/dL)	0,5 ± 0,07	0,3 – 0,6	0,2 – 0,5	0,5 ± 0,05
Uréia (mg/dL)	48 ± 7,6	41,0 – 44,6	12,3 – 24,6	35,9 ± 3,58
Ácido Úrico (mg/dL)	1,34± 0,23*	1,4±0,3**	1,6±0,1***	3,2±0,15***

3721 \*Hua *et al.* (2012) \*\* Rodrigues *et al.* (2006)\*\*\* Chen *et al.* (2011)

3722

3723

3724

3725 Parâmetros bioquímicos urinários de ratos machos Wistar adultos encontrados em outros  
3726 estudos.

Parâmetros (unid.)	Hua <i>et al</i> (2012)	Hu <i>et al.</i> (2010)	Zhang <i>et al.</i> (2012)
Ácido Úrico (mg/dL)	32,73 ± 5,53	75,81 ± 5,74	8,72 ± 0,39
FEUA	20,47±1,61	16,41 ± 0,35	x-x-x
BUN	20,47 ± 1,61	x-x	11,70 ± 0,20

3727

3728

3729 **5.4.Cópia do parecer do comitê de ética e pesquisa**

3730



3731 **MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
3732 **FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS**  
3733 **PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**  
3734  
3735

---

3736

3737 **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA**

3738

3739

3740

Dourados-MS, 06 de agosto de 2014.

3741 Senhor Pesquisador:

3742 **Márcio Eduardo de Barros**

3743

3744 O Projeto de sua responsabilidade – Protocolo nº. **015/2014** –3745 **CEUA/UFGD** - intitulado **“Efeito do extrato de Echinodorus macrophyllus**3746 **sobre a hiperuricemia induzida em ratos”** foi integralmente **APROVADO** e

3747 poderá ser conduzido.

3748

3749

3750

3751 Ressaltamos que é de responsabilidade do (a) pesquisador (a) envio

3752 de notificação à CEUA sobre o término do projeto.

3753

3754

3755

3756

Melissa Negrão Sepulveda

3757

Coordenadora CEUA

3758

3759 Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFGD – Rua João Rosa Góes, 1761 – Vila

3760 Progresso.

3761

Dourados/MS. E-mail: [ceua@ufgd.edu.br](mailto:ceua@ufgd.edu.br)

3762

3763

3764

3765

3766

3767

3768

3769

3770 **Parecer do Comitê de Ética no Uso de Animais**

3771

3772



3773

3774

3775

3776

3777

3778

3779

3780

3781

3782

3783

3784

3785

3786

3787

3788

3789

3790

3791

3792

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS  
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**

**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA**

Dourados-MS, 11 de dezembro de 2014.

Senhor Pesquisador:

**Márcio Eduardo de Barros**

O Projeto de sua responsabilidade – Protocolo nº. **015/2014 – CEUA/UFGD** - intitulado **“Efeito do extrato de Echinodorus macrophyllus sobre a hiperuricemia induzida em ratos e seu efeito toxicológico”** teve sua solicitude de incluir a este protocolo os testes de Toxicidade Aguda, Subaguda, Ensaio do Micronúcleo em Sangue Periférico e Cometa, **APROVADO** e poderá ser conduzido.

Ressaltamos que é de responsabilidade do (a) pesquisador (a) envio de notificação à CEUA sobre o término do projeto.

A handwritten signature in black ink that reads "Melissa Negrão Sepulvida".

3793

3794

3795

3796

3797

3798

3799

3800

3801

3802

3803

3804

3805

3806

3807

3808

3809

3810

3811

3812

---

Melissa Negrão Sepulvida-Coordenadora CEUA

## 3813 **5.5. Estudos antimicrobianos**

3814

### 3815 **Metodologia**

3816

#### 3817 **Avaliação da atividade antimicrobacteriana**

3818 A CIM (concentração inibitória mínima) foi determinada em ensaio de microdiluição em  
3819 caldo. A microdiluição foi baseada nos procedimentos adotados de acordo com a Norma  
3820 Aprovada na Oitava Edição da CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), 2009  
3821 [1]

3822 Os micro-organismos utilizados nos testes foram obtidos através do Laboratório de Pesqui-  
3823 sa de Ciências da Saúde (LPCS) da Universidade Federal da Grande Dourados. O EEM foi  
3824 testado frente aos micro-organismos patógenos: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923),  
3825 *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella sp* (ATCC 13076), *Pseudomonas aeruginosa*  
3826 (ATCC 27853), e *Candida albicans* (ATCC 90028). Antes dos ensaios, as linhagens foram  
3827 cultivadas a 35°C por 24 horas em *Brain Heart Infusion Broth* – BHI (HIMEDIA  
3828 Laboratories).

3829 Utilizou um inóculo de 100 µL de cada linhagem, com uma concentração de 10<sup>5</sup> UFC/mL  
3830 em placas de microtitulação com 96 poços. Em cada poço com as respectivas linhagens foi  
3831 adicionado 100 µL de cada extrato, o qual foi diluído e as concentrações finais variaram de  
3832 1000 – 7,8 µg/mL. Para os controles foram utilizados os antibióticos padrão Tetraciclina,  
3833 Meropenem e o antifúngico Fluconazol. Também foi feito um controle do solvente tween  
3834 20, controle negativo (contendo somente meio de cultura) e controle positivo testando a  
3835 suspensão bacteriana.

3836 As CIMs foram registradas como as menores concentrações para a inibição do crescimen-  
3837 to. Para evidenciá-la, preparou-se uma solução indicadora de resazurina sódica em água  
3838 destilada estéril na concentração de 0,01% (p/v). Após a incubação, 20 µL da solução indi-  
3839 cadora foram adicionados em cada cavidade, sendo as mesmas incubadas por 1 hora a

3840 temperatura ambiente [2]O ensaio antibacteriano foi realizado em duplicata e os resultados  
3841 expressos como média das repetições[3]

3842

## 3843 **Resultados**

### 3844 **Concentração Inibitória Mínima (CIM)**

3845 Os resultados da CIM do EEM através da técnica da microdiluição demonstrou que para as  
3846 bactérias *Salmonella sp*, *Pseudomonas aeruginosa* e para o fungo *Candida albicans*, o  
3847 EEM não apresentou atividade nas dosagens testadas, enquanto que para as espécie *Staph-*  
3848 *ylococcus aureus* e *Escherischia coli* apresentou atividade inibitória moderada na concen-  
3849 tração de 500 µg/mL.

3850

## 3851 **Discussão**

3852 Como a tendência do aumento da resistência ao tratamento com antibióticos é considerada  
3853 um problema de saúde pública[4], a medicina tradicional tem sido uma forma alternativa  
3854 para combater as bactérias e o que reafirma a necessidade de investigar a atividade  
3855 antimicrobiana das plantas medicinais[5]. Além disso, a presença de flavonóides das  
3856 plantas apresentam efeitos antimicrobianos, sendo detectados no estudo de Oliveira *et al*[6]  
3857 onde as folhas da *Leonotis Nepetifolia* L, popularmente conhecida no Brasil como "cordão-  
3858 de-frade", contém elevado teor de flavonóides com potente atividade antibacteriana. Outra  
3859 pesquisa com flavonóides como a chrysin, a mesma demonstrou atividade bacteriostática  
3860 contra diferentes bactérias Gram negativas, tais como: *Echerichia coli* e *Pseudomonas*  
3861 *aeruginosa*, e nos flavonóides luteolina, lucenin, apgenina, saponarin e vitexina foi  
3862 demonstrado eficácia contra as bactérias Gram negativas *Enterobacter cloacae*, *klebsilla*  
3863 *pneumonia*, *Proteus mirabilis*, *Echerichia coli* e *Proteus vulgaris* [7]. Além do que, os  
3864 flavonóides apresentam comportamento sinérgico e aditivo em combinação com outros  
3865 agentes microbianos [8]. Nos testes de atividade inibitória frente a micro-organismos, deste

3866 estudo, o EEM teve ação moderada (500 µg/mL)[9, 10] frente às bactérias *Echerichia coli*  
3867 e *Staphylococcus aureus*, assemelhando-se ao estudo de Vidal *et al* [11]que demonstraram  
3868 moderada atividade antimicrobiana do extrato liofilizado do EEM para as culturas de  
3869 *Echerichia coli*.

3870

### 3871 **Conclusão**

3872

3873 Conclui-se que o EEM possui atividade antimicrobiana *in vitro*, moderada para as bactérias  
3874 *Echerichia coli* e *Sthaphylococcus aureus*.

3875

3876

- 3877 1 Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI. Methods for dilution  
3878 Antimicrobial Susceptibility tests for bacteria that Grow Aerobically 2009: 29.
- 3879 2 Javadpour MM, Juban MM, Lo WC, *et al*. De novo antimicrobial peptides with low  
3880 mammalian cell toxicity. *J Med Chem* 1996;39(16):3107-13.
- 3881 3 Palomino, J. C.; Martin, A.; Camacho, M.; Guerra, H.; Swings, J.; Portaels, F.;  
3882 *Antimicrob. Agents Chemother* 2002; 46:2720.
- 3883 4 Davison HC, Low JC, Woolhouse ME. What is antibiotic resistance and how can  
3884 we measure it? *Trends Microbiol* 2000;8(12):554-9.
- 3885 5 Taylor PW. Alternative natural sources for a new generation of antibacterial agents.  
3886 *Int J Antimicrob Agents* 2013;42(3):195-201.
- 3887 6 Oliveira DM, Melo FG, Balogun SO, *et al*. Antibacterial mode of action of the  
3888 hydroethanolic extract of *Leonotis nepetifolia* (L.) R. Br. involves bacterial  
3889 membrane perturbations. *J Ethnopharmacol* 2015.
- 3890 7 Bylka W, Matlawska I, Pilewski NA. Natural flavonoids as antimicrobial agents. *J*  
3891 *Am Nutraceutical Assoc* 2004;7(2):24-31.
- 3892 8 Amin MU, Khurram M, Khattak B, Khan J. Antibiotic additive and synergistic  
3893 action of rutin, morin and quercetin against methicillin resistant *Staphylococcus*  
3894 *aureus*. *BMC Complement Altern Med* 2015;15:59.
- 3895 9 Dall'Agnol R, Ferraz A, Bernardi AP, *et al*. Antimicrobial activity of some  
3896 *Hypericum* species. *Phytomedicine* 2003;10(6-7):511-6.
- 3897 10 Fabry W, Okemo PO, Ansorg R. Antibacterial activity of East African medicinal  
3898 plants. *J Ethnopharmacol* 1998;60(1):79-84.
- 3899 11 Vidal LS, Alves AM, Kuster RM, Lage C, Leitão AC. Genotoxicity and  
3900 mutagenicity of *Echinodorus macrophyllus* (chapéu-de-couro) extracts. *Genet Mol*  
3901 *Biol* 2010;33(3):549-57.

3902