

1 INTRODUÇÃO

Doenças do trato urinário têm se tornado cada vez mais frequente e afetando um maior número de pessoas. Sua incidência pode estar associada nos ritmos acelerados de fatores alimentares, trabalho e genética. A urolitíase é um processo complexo, que resulta de uma sucessão de várias propriedades físico-químicas, incluindo eventos sobressaturação, a nucleação, crescimento, agregação e retenção no interior dos túbulos renais (Khan, 2012). É importante salientar que não existe qualquer droga satisfatória usado na terapia clínica para o tratamento da urolitíase, que requerem, por conseguinte, um tratamento preventivo. Portanto, vale a pena procurar uma alternativa a estes meios, usando plantas medicinais ou fitoterápicos.

Persea americana Mill., (Lauraceae), conhecida popularmente como o abacateiro, é uma árvore de aproximadamente 20 m, nativa da América Central, cultivada em vários países de climas tropicais ou subtropicais de todo o mundo (Schultz, 1990). As folhas desta planta têm sido amplamente utilizados em medicamentos tradicionais para o tratamento de doenças renais (Agra *et al.*, 2007.), pressão arterial elevada, diabetes (Andrade-Cetto e Heinrich, 2005; Andrade-Cetto *et al.*, 2006), antipirética e analgésica (Di Stasi *et al.*, 2002), diurético, estomacal e do ducto biliar (Balmé, 1978; Malik e Camm, 1995, De A Ribeiro, 1986; Ross, 1999). Além do uso tradicional das suas folhas, os frutos são muito utilizados pelos seres humanos e por alguns animais como produto alimentar de alto valor nutritivo. Além do óleo de abacate, polpa de fruta contém hidratos de carbono e mais proteína do que muitos outros frutos, enquanto que o seu conteúdo de vitaminas A e B são elevadas (Ross, 1999; Watt e Breyer-Brandwijk, 1962).

Estudos fitoquímicos anteriores sobre as folhas de *P. americana* mostrou a presença de derivados de heptadecanol, taninos, (Owolabi *et al.*, 2005, 2007, 2010), saponinas, esteróides (Adeyemi *et al.*, 2002), glicósidos triterpenóides (Adeboye *et al.*, 1999), cumarinas e flavonoides (Lee *et al.*, 2012). Outros estudos preliminares sobre os efeitos farmacológicos de *P. americana* mostrou que o extrato de folhas possui efeito vaso-relaxante do anel aórtico de ratos e menor pressão arterial (Owolabi *et al.*, 2005; Adeboye *et al.*, 1999), efeito protetor contra hepatotoxicidade induzida por paracetamol

(Adeyemi *et al.*, 2002), propriedades analgésico, anti-inflamatório e anti-convulsiva (Adeyemi *et al.*, 2002; Ojewole e Amabeoku, 2006), impede ou retarda o progresso de várias doenças relacionadas com o estresse oxidativo (Owolabi *et al.*, 2010), hiperglicêmico (Antia *et al.*, 2005), antidiabéticos e possivelmente age para regular a absorção de glicose no fígado e nos músculos por meio de PKB/Akt ativação, o restabelecimento do equilíbrio de energia intracelular (Lima *et al.*, 2012) e para o tratamento de infecções por vírus herpes (Miranda *et al.*, 1997).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Anatomofisiologia Renal

O sistema urinário, encarregado da produção, coleta e eliminação da urina está localizado no espaço retroperitoneal, de cada lado da coluna vertebral dorso-lombar. É constituído pelos rins direito e esquerdo, a pelve renal, que recebe os coletores de urina do parênquima renal, os ureteres, a bexiga e a uretra (Fig 1) (Guyton e Hall, 2006).

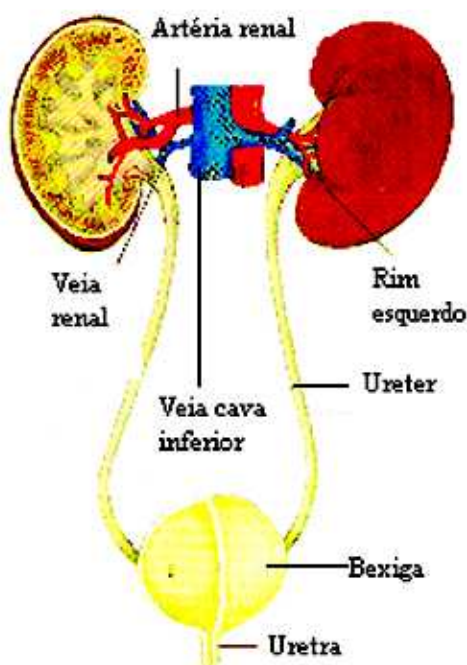


Fig 1 – Órgãos do sistema urinário. Fonte: www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/corpo-humano-sistema-urinario/sistema-urinario-14.php, acessado em 10/02/2013.

O rim é responsável pela filtração do plasma e excreção de constituintes desnecessários. Além disso, possui função endócrina, na produção de hormônios, como renina e eritropoetina (Guyton e Hall, 2006). Está localizado entre as vértebras L1 e L4, apresenta aproximadamente 12 cm de comprimento, pesando em média 150 g. Macroscopicamente, o rim pode ser dividido em córtex e medula. O córtex se constitui de glomérulos, túbulos contorcidos proximais e distais. Já a medula, contém as alças de Henle e os túbulos coletores, os quais se abrem nas papilas dos cálices menores (Berman, 1969).

Os néfrons são unidades funcionais completas que constituem o rim, eles são capazes de filtrar e formar a urina independentemente dos demais. É constituído basicamente por um glomérulo envolvido pela cápsula de Bowman, que tem a função de filtrar o sangue, e um longo túbulo que desemboca nos tubos coletores de urina, que absorvem parte do líquido filtrado (Guyton e Hall, 2006). Diariamente, os glomérulos filtram em média 180 litros de plasma, sendo 1 % desse volume excretado em forma de urina, o que resulta aproximadamente 1,5 L de urina por dia. Produtos resultantes do metabolismo como uréia, ácido úrico, sulfatos, ácidos em excesso, fosfatos, são eliminados em grande quantidade (Beyenbach, 2004; Carter, 2012; Guyton e Hall, 2006; Thomson e Blantz, 2008).

A pressão do sangue nos glomérulos produz a filtração de líquido para o interior da cápsula de Bowman, de onde escoar para o túbulo proximal. Do túbulo proximal o líquido penetra na alça de Henle, que tem uma porção com parede muito fina. Da alça de Henle, o líquido penetra no túbulo distal que se insere num canal coletor, juntamente com os túbulos distais de diversos outros glomérulos. O canal coletor acumula a urina proveniente de vários néfrons e se lança na pelve renal e é chamado de filtrado glomerular, sendo transformado em urina à medida que passa pelos túbulos proximal e distal (Fig 2) (Guyton e Hall, 2006).

O túbulo contorcido proximal tem função de reabsorver a maioria dos pequenos solutos filtrados (sódio, potássio, cloreto, cálcio e bicarbonato, aminoácidos e glicose) de forma passiva, pois esse local é permeável à água. A alça de Henle possui um mecanismo de contra-corrente através da criação de um interstício medular hipertônico. Já nos túbulos distais, agem a aldosterona, que auxiliam na reabsorção de sódio e secreção de potássio e também o hormônio antidiurético (ADH), que regula a diurese

através da reabsorção de água nos ductos coletores. Por fim, o ducto coletor, que realiza também as funções do túbulo contorcido distal, tem importância na secreção de ácido através do amônio e no mecanismo contracorrente com a ureia (Thomson e Blantz, 2008).

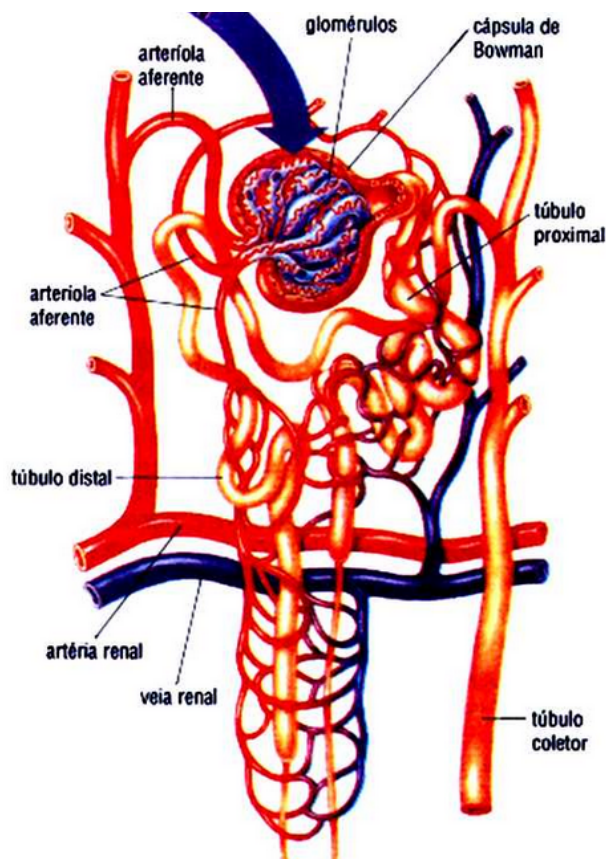


Fig 2 - Esquema completo do néfron. Fonte: www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/corpo-humano-sistema-urinario/sistema-urinario-14.php, acessado em 10/02/2013.

2.2 Toxicidade aguda

Toxicidade refere-se à capacidade de determinada substância, produto ou conjunto de substâncias de provocar efeitos danosos aos organismos com os quais entra em contato. Estes efeitos podem ser desde alterações comportamentais, de crescimento ou reprodução até a morte dos organismos (Arenzon *et al.*, 2011).

Para estimar o grau de impacto que uma determinada substância pode causar no organismo receptor realizam-se ensaios de toxicidade com organismos-teste cujo objetivo é simular, em laboratório *in vivo*, os efeitos que poderiam ser observados no

organismo receptor após a administração da substância. Organismos-teste são espécies mantidas em laboratório, geralmente ratos Wistar fêmeas, pois apresentam maior sensibilidade para apresentar sinais toxicológicos. Esses testes seguem as normas de protocolos de toxicidade determinados pela OECD (Guidelines for Testing of Chemical, Oral Toxicity) (OECD, 2001).

São três tipos de ensaios de toxicidade: aguda, sub-aguda e crônica. O ensaio de toxicidade aguda avalia a capacidade de uma determinada substância de causar efeitos danosos aos animais após um curto período de exposição à amostra, de 14 dias, sendo administrada uma única dose de 2000 mg/kg; na sub-aguda são administradas doses diárias de no máximo 1000 mg/kg da substância durante 28 dias; quando se faz a administração de doses diárias por 90 dias ou mais é chamado toxicidade crônica. Nesse período são avaliados variações de peso corporal e no consumo de ração e água, sinais clínicos (piloereção, contorções, tremores, convulsões, cianose, ataxia, diarreia) e mudanças comportamentais (normalmente inferior a 96 horas) (OECD, 2001).

2.3 Classes dos diuréticos

Os diuréticos são fármacos que aumentam a velocidade de formação da urina, atuando principalmente no rim. Aumentam a excreção de eletrólitos (especialmente íons sódio e cloreto) e de água, e com isto, diminuem o volume dos fluidos corporais. São usados no tratamento de condições edematosas (ex: insuficiência cardíaca, síndrome nefrótica, doenças crônicas do fígado), controle da hipertensão, hipercalcemia, *diabetes insipidus*, hiperaldosteronismo primário e glaucoma (Cervoni e Chan, 2000). Eles são divididos em diferentes classes conforme local e mecanismo de ação. Os que atuam sobre o túbulo contorcido proximal, inibem a anidrase carbônica renal, diminuindo a reabsorção de bicarbonato de sódio (ex. acetazolamida), resultando em aumento do fluxo de urina alcalina e acidose metabólica. A perda urinária de bicarbonato causa depleção do bicarbonato extracelular, e o efeito diurético dos inibidores da anidrase carbônica, conseqüentemente, é autolimitado (Rose, 1991).

Os diuréticos de alça são os mais potentes, capazes de causar a eliminação de 15-25% do Na⁺ filtrado. O principal exemplo é a furosemida, que são fármacos que diminuem a reabsorção do sódio no ramo ascendente da alça de Henle por inibir o sistema de transporte Na⁺, K⁺, Cl⁻, sendo que a quantidade de excreção urinária de sódio

e perda de líquido podem ser aumentadas consideravelmente por estes agentes. Os efeitos secundários do aumento da excreção de sódio são: excreção urinária aumentada (devido ao gradiente osmótico) e aumento da secreção tubular distal de potássio. Especialmente nos idosos, são comuns os efeitos indesejáveis diretamente relacionados à ação renal dos diuréticos de alça, tais como hipovolemia, hipotensão, hipocalemia, alcalose metabólica, hiperuricemia e perda de audição relacionada à dose (Brater, 1991; Saier e Boyden, 1984).

Com relação aos diuréticos que atuam sobre o túbulo distal, incluem-se os tiazídicos (hidroclorotiazida, bendrofluazida) que geralmente são utilizados no tratamento de hipertensão (Cervoni e Chan, 2000). Os tiazídicos ligam-se ao sítio do Cl⁻ do sistema de co-transporte tubular distal de Na⁺/Cl⁻, inibindo sua ação e causando natriurese com perda de íons cloreto, seus efeitos sobre o balanço de Na⁺, K⁺, H⁺ e Mg⁺⁺ são qualitativamente semelhantes aos dos diuréticos de alça, mas de menor magnitude. Em contraste com os diuréticos de alça, entretanto, os tiazídicos reduzem a eliminação de Ca⁺⁺. Efeitos indesejáveis como hipocalciúria, hiponatremia, hipocalemia são comuns (Salveti e Ghiadoni, 2006).

Existem também os diuréticos que atuam indiretamente por modificação do conteúdo do filtrado, são os diuréticos osmóticos. Trata-se de substâncias inertes (ex. manitol) filtradas no glomérulo que não são reabsorvidas pelo néfron. O principal efeito dos diuréticos osmóticos é aumentar a quantidade de água eliminada com eliminação de Na⁺. A indicação dessa classe é limitada incluindo o tratamento de emergência de hipertensão intracraniana aguda ou de elevação aguda da pressão intra-ocular. (Rang e Dale, 2007; Rose, 1991).

Outra classe dos diuréticos são os poupadores de potássio que são classicamente agentes anti-hipertensivos fracos, mas quando usados em associação com outros diuréticos (tiazídicos ou de alça) são benéficos em pacientes propensos à hipopotassemia. Pertencem a esta classe a espironolactona, a amilorida e o triantereno. O mecanismo de ação da espironolactona deve-se a inibição competitiva da aldosterona no final do túbulo distal e no ducto coletor, levando ao bloqueio da reabsorção de sódio, que provoca um aumento na eliminação de água e sódio e a retenção de potássio. Já a amilorida e o triantereno não interferem com a ligação da aldosterona. Entre os efeitos indesejáveis causados pelos diuréticos poupadores de potássio, ressalta-se a

hiperpotassemia, que pode induzir arritmias e ginecomastia (crescimento das mamas) (Rose, 1991).

Baseado nos efeitos indesejáveis que os diuréticos disponíveis no mercado apresentam, se faz necessária a busca de estudos de plantas medicinais na tentativa de encontrar novas substâncias que os minimizem (Wright *et al.*, 2007).

2.4 Urolitíase

A urolitíase, também conhecida como pedra nos rins, cálculo renal, calculose ou nefrolitíase, é uma doença que na maioria das vezes causa dores intensas, com baixo índice de mortalidade, porém é a que causa mais morbidade dentre as afecções urinárias, levando a internações e dias de trabalho perdidos (Gambaro *et al.*, 2004; Stoller, 2004). Os cálculos são sua maior causa de morbidade, incidindo 5 a 15% da população, entre 20 e 50 anos de idade, e acometendo ambos os sexos, mas com maior frequência o masculino (Sebben e Brum, 2007), sendo que a prevalência possui variações regionais, pois a ocorrência aumenta em regiões quentes e ensolaradas (Sharma e Filler, 2010; Xu *et al.*, 2011).

Vários fatores influenciam a formação dos cálculos urinários incluindo os epidemiológicos (sexo, idade, raça, herança genética, etc.), anormalidades do pH e do volume urinário, dieta, desequilíbrio entre os fatores promotores e inibidores da cristalização e os estados de hiperexcreção de cálcio, oxalato, ácido úrico, cistina, etc., os quais geram uma situação de supersaturação da urina (Lewandowski e Rodgers, 2004). Além destes fatores, as ocupações profissionais principalmente associadas ao sedentarismo e à altas temperaturas, também atuam como fatores que podem promover a nefrolitíase (Borghetti *et al.*, 1993; Zheng *et al.*, 2002).

Os cálculos urinários são constituídos por uma parte cristalina e uma matriz orgânica. A porção cristalina geralmente é composta por sais de cálcio (oxalato de cálcio, fosfato de cálcio ou ambos), ácido úrico, amônio magnésico e carbonato de apatita, existindo nítida predominância de cálcio na sua constituição (Sakhaee *et al.*, 2012). A matriz orgânica por sua vez compreende aproximadamente 2,5% do peso total do cálculo e é constituída predominantemente de proteínas e macromoléculas mistas,

como por exemplo a proteína de Tamm Horsfall, albumina, hemoglobina, transferrina, glicosaminoglicanos, lipídeos, entre outras e até resíduos orgânicos. Além disso, açúcares, nitrogênio e água também são detectados na matriz dos cálculos (Smith e Willians, 1971; Khan, 1997).

A litogênese é um complexo processo que ocorre em diversas partes do trato urinário, e é composto por várias sequências: supersaturação da urina, nucleação, crescimento do cristal, agregação e retenção do cristal (Hamamoto *et al.*, 2011).

O nível de saturação é um estado em que, sob determinada temperatura e pH, a concentração de sais atinge o limite de solubilidade. Se o nível de solutos aumenta além do nível de saturação, o sistema ficará em estado de supersaturação, de maneira termodinamicamente instável. Essa condição é essencial para a formação de cálculos renais, pois a formação de cristais na urina tem início a partir de uma supersaturação (Coe *et al.*, 2011; Hamamoto *et al.*, 2011).

Após essa fase, ocorre a nucleação, o qual consiste em atingir um estado termodinâmico menos instável. Durante esse processo, íons e moléculas se ligam, e formam cristais, que dessa forma, reduz o excesso de energia livre. A nucleação ocorre usualmente em superfícies pré-existentes, como hemácias ou células epiteliais, e nesse caso, ocorre uma nucleação heterogênea. No entanto, a nucleação também pode acontecer a partir da precipitação de cristais devido a supersaturação, o que ocorre na nucleação homogênea (Coe *et al.*, 2011; Hamamoto *et al.*, 2011).

Devido às altas interações entre as partículas no trato urinário, cristais formados e outros componentes, que podem se ligar a estrutura do cristal, acarretam a um aumento do cristal. Os cristais formados se aproximam e se unem uns aos outros. Esse processo é chamado de agregação (Hamamoto *et al.*, 2011; Sakhaee *et al.*, 2012).

Na fase de retenção dos cristais, é necessário que eles estejam ancorados em células epiteliais, para que dessa forma, possam crescer e tornarem-se cálculos. Esse crescimento pode ocorrer quando a urina está supersaturada, ou quando existem novas partículas que se agregam ao cálculo (Hamamoto *et al.*, 2011; Sakhaee *et al.*, 2012).

Além da supersaturação, várias substâncias podem facilitar ou induzir a cristalização, estas substâncias são conhecidas como promotores da cristalização, e incluem principalmente macromoléculas e íons (Ryall, 1996). Em particular o oxalato e o fosfato, atuam como promotores da cristalização, pois se complexam com o cálcio

formando respectivamente precipitados insolúveis de oxalato de cálcio e fosfato de cálcio. Com relação às macromoléculas sua presença nos cálculos sugere um envolvimento na patogênese da litíase urinária, porém se elas atuam como moduladores, promotores ou inibidores da cristalização e crescimento do cálculo, ainda permanece controverso. Há evidências de que macromoléculas e proteínas possam ter funções diversas na cristalização, agregação e crescimento dos cálculos (Soucie *et al.*, 1994; Scurr e Robertson, 1986).

Por outro lado, há substâncias que podem inibir a formação dos cálculos, destacando-se os glicosaminoglicanos (GAGs), o magnésio e o citrato (Michelacci *et al.*, 1992; Shum e Gohel, 1993; Hiatt *et al.*, 1996). Há fortes evidências que indicam a participação de proteínas presentes na urina, as quais podem inibir ou modular as várias etapas de formação do cálculo, entre elas destacam-se a bicunina, a proteína de Tamm-Horsfall, o fragmento-1 da protrombina, a nefrocalcina, a albumina humana e a fibronectina. Entretanto, da mesma forma que existem controvérsias em relação aos promotores, existem dados conflitantes com relação ao real papel dessas proteínas como inibidoras da litíase (Atmani *et al.*, 1993; Ryall *et al.*, 1991; Buchholz *et al.*, 1999).

Dentre os cálculos renais acometidos na população 80% são formados por oxalato de cálcio. Esse sal pode ser encontrado em três diferentes formas: cristais de oxalato de cálcio monohidratado (COM), diidratado (COD) e triidratado (COT) (Mandel e Mandel, 1980). O COM apresenta maior afinidade por membranas celulares do epitélio do túbulo renal, constitui a forma mais estável e sua presença é predominante nos cálculos renais (Tomazic e Nancollas, 1979; Prien e Prien, 1968). A forma COM apresenta superfície externa irregular e, internamente os cristais se depositam de modo concêntrico ao núcleo. O COD é mais solúvel do que o COM e predomina na urina de indivíduos não formadores de cálculo. A COT é a forma termodinâmica mais solúvel e mais rara de ser observada. Estas características indicam que a forma monohidratada do cristal de oxalato de cálcio está mais diretamente relacionada com a fisiopatogênese da litíase urinária. (Priem e Priem, 1968).

O risco de recorrência para urolitíase é individual para o paciente, e também o tratamento médico é específico. Dessa forma, uma breve avaliação do risco após a passagem da doença, é necessária para definir o alto risco de recorrência. Cerca de 25% de todos os pacientes urolitiásicos são de alto risco ou sofrem severas desordens

metabólicas, e ambas necessitam de terapia médica. No entanto, os outros 75% se beneficiam o suficiente de medidas preventivas, como alta ingestão de fluidos, dieta mista balanceada e mudanças no estilo de vida (Straub, 2011).

No Brasil, não há estudos epidemiológicos referidos a litíase urinária, no entanto estima-se que deva variar entre 3-8% à semelhança de outros países ocidentais (Robertson *et al.*, 1980). Segundo dados oficiais do departamento de Informação e Informática do SUS/DATASUS (Brasil, 2012), em 2011 ocorreram 66.254 internações por urolitíase, o que representa um custo de mais 30 milhões de reais em internações, um crescimento de 4,2% em relação a 2010 e 3,1% a 2009. Além disso, os pacientes atendidos pelos serviços de pronto-atendimento do país não estão contabilizados, assim o valor gasto para urolitíase deve ser mais elevado (Brasil, 2012).

O tratamento da urolitíase é realizado durante a crise renal, para remoção e para prevenção, o que varia de acordo com a composição da pedra (Brenner *et al.*, 2011). Para as pessoas que manifestam cólicas renais é realizado tratamento através de antiespasmódicos e anti-inflamatórios não esteroidais (Brenner *et al.*, 2011; Sakhaee *et al.*, 2012) e o procedimento para eliminação do cálculo é por meio de litotripsia extracorpórea ou cirurgia, que propicia riscos e efeitos indesejados (Brenner *et al.*, 2011).

Na terapêutica e prevenção da doença litiásica, é feito o tratamento dietético (nos casos hiperexcreções) e o tratamento farmacológico, no qual são usado tiazídicos, citratos, alopurinol e outras medicações, que possuem significantes efeitos colaterais e não são específicos na degradação do cálculo renal (Allie-Hamdulay e Rodgers, 2005; Carter, 2012; Fernández-Rodríguez *et al.*, 2006 ; Moe *et al.*, 2011). Com base na alta frequência da recorrência dos cálculos, a profilaxia clínica pode ser fundamental na economia para os sistemas de saúde, e melhoria nas condições de saúde dos pacientes (Moe *et al.*, 2011).

2.5 Plantas Medicinais

A utilização de plantas medicinais como recurso terapêutico é tão antiga quanto a civilização humana (Eisenberg *et al.*, 1998). Grande parte da população mundial as utiliza como principal recurso no atendimento básico de saúde, incluem-se aí quem as usam *in natura* (por opção ou por ser a única alternativa disponível) e os sistemas de

medicina que empregam plantas processadas em formulações medicamentosas, como a medicina chinesa e ayurvédica (tradicional indiana) (Gaspari, 2005).

O Brasil destaca-se por ser o país com maior biodiversidade mundial neste aspecto, possuindo 22 % de todas as espécies biológicas do mundo (Marques, 2000). A maioria das descobertas do potencial terapêutico das plantas se deu com base no conhecimento empírico transmitido pelas gerações e pelos povos indígenas ao longo dos anos (Paulino, 1996).

Para o tratamento de afecções urinárias várias plantas medicinais são utilizadas na cultura popular mundial como o uso de *Costus spiralis* (cana-do-brejo ou cana-de-macaco) (Viel *et al.*, 1999) e de *Phyllanthus niruri* (quebra-pedra) (Barros *et al.*, 2003; Barros *et al.*, 2006; Campos e Schor, 1999; Freitas *et al.*, 2002; Nishiura *et al.*, 2004), que têm sido preconizado para o tratamento de cálculos renais. Alguns estudos demonstram efeito de algumas plantas sobre a diurese como a *Elephantopus scaber* (língua-de-vaca), *Alpinia speciosa* (colônia) (Laranja *et al.*, 1991, 1992), *Tradescantia diuretica* (trapoeraba) (Laranja *et al.*, 1992) e *Piper aduncum* (pimenta-de-macaco) (Van den Berg, 1993).

2.5.1 Família Lauraceae e o gênero *Persea*

A família Lauraceae, pertence à divisão Angiospermae; classe Magnoliopsida; subclasse I Magnoliidae; ordem Magnoliales, segundo o sistema de classificação de Cronquist (1988). Possui 2.500 espécies distribuídas em 50 gêneros. O gênero *Persea* é composto por 50 espécies, originárias de regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo, especialmente nas florestas da América Central, América do Sul, África e parte da Ásia (Zecca, 2012).

Espécimes são árvores e arbustos com folhas simples, alternas, membranáceas ou coriáceas, dotadas de cheiro característico proveniente de células cheias de óleos e essências aromáticas voláteis. Flores pequenas, cíclicas, homoclamídeas, actinomorfas, trímeras, geralmente, fruto tipo baga ou drupa, possuem a base mais ou menos envolta por uma cúpula carnosa, ou então reduzida a um disco plano (Zecca, 2012).

Entre as Lauráceas estão algumas das principais espécies consideradas como produtoras de madeira de lei, em especial da Mata Atlântica e em florestas da região

Sul. Várias espécies dessa família são utilizadas comercialmente como a *Sassafras officinales* (sassafrás) que é empregada para aromatizante de sabões, goma de mascar, perfumes, etc., o *Laurus nobilis* (louro) uma planta ornamental, aromática e medicinal e é empregado em perfumaria e produtos farmacêuticos, a *Cinnamomum zeylanicum* (canela-de-cheiro) que é utilizada na culinária, medicina e perfumaria (Schultz, 1990).

2.5.1.1 *Persea americana* Mill.

Persea americana Mill. (Fig 3), chamado popularmente como abacateiro, é uma árvore de grande porte atingindo 20 metros de altura, nativo da América Central porém encontrado em vários países de climas tropicais ou subtropicais (Leite *et al.*, 2009). É irregularmente esgalhada, com casca áspera, cinzento-escuro (Balmé, 1978; Albuquerque, 1989) que prefere solos férteis, úmidos e clima ameno (Martins, 1995); suas folhas são coriáceas pecioladas, simples, alternas; as flores são completamente cíclicas, trímeras, o perigônio indiferenciado e pequeno, formado 3 mais 3 tépalas e o androceu por 3 a 4 verticilos de três estames, inflorescências em panículas e branco-esverdeadas (Schultz, 1990); frutos tipo baga piriforme, de casca verde-escuro e de polpa gordurosa; semente grande com dois cotilédones (Angely, 1958).



Fig 3 - *Persea americana* Mill. Fonte: Arrigo, 2013.

A polpa do abacate pode ser consumida crua, cozida ou em conservas. Ela geralmente é preparada em pratos salgados, como patês, sopas e saladas, mas também pode ser consumida esmagada ou batida com açúcar e leite, como sobremesa ou vitamina. É um fruto nutritivo, rico em vitamina E, A, B e gorduras monoinsaturadas, sendo utilizado, na medicina popular para baixar colesterol, regulação hormonal, fortalecimento dos vasos sanguíneos e previne o envelhecimento (Lee *et al.*, 2012).

Estudos mostram que as partes utilizadas para o preparo de remédios são as folhas, provavelmente por causa da facilidade de coleta e por estar presente na planta, durante a maior parte do ano (Alves *et al.*, 2008). A infusão de folhas de *P. americana* é

utilizada na medicina popular para doenças renais, perturbações hepáticas, hipertensão, diabetes, diurético, estomáquico e colagogo (Balmé, 1978; Martins, 1995). As mesmas apresentam constituintes químicos como os polifenólicos, triterpenóides, fitoesteróis, antocianinas (Watt e Breyer-Brandwijk, 1962; Ross, 1999), triterpenos, cumarinas, alcalóides, taninos e flavonóides (Watt e Breyer-Brandwijk, 1962; Ross, 1999; Lima *et al.*, 2012). Outros trabalhos demonstraram que o extrato de folhas possui atividades analgésica, anti-inflamatória (Adeyemi *et al.*, 2002), antioxidante (Lima *et al.*, 2012), hipoglicemiante (Antia *et al.*, 2005), hipotensor e anti-hipertensivo (Adeboye *et al.*, 1999; Owolabi *et al.*, 2005), sendo que, dentre os trabalhos desenvolvidos, não houve relatos de sinais toxicológicos com essa planta (Mohammad *et al.*, 2010; Leite *et al.*, 2009; Ozolua *et al.*, 2009).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial diurético e antilitiásico do extrato etanólico de folhas de *Persea americana* Mill.

3.2 Objetivos Específicos

Avaliar a ação do extrato etanólico de folhas da espécie de *P. americana* (EEPA) nos testes:

- toxicidade aguda;
- diuréticos e natriuréticos em ratos Wistar;
- antilitiásicos na cristalização *in vitro*;

Avaliar o potencial antilitiásico das frações semi-purificadas hexano (FH), clorofórmio (FCH), acetato de etila (FAE) e hidroetanólico (FHE) na cristalização *in vitro*.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

5 ANEXO

5.1 Artigo científico

O artigo científico segue as normas do periódico internacional, *Journal of Ethnopharmacology*, o qual será submetido.

Diuretic and antilithiasic effects from leaves of *Persea americana* Mill. (Lauraceae)

Jucicléia da Silva Arrigo^a, Anelise Samara Nazari Formagio^b, Marciane Maximo Siqueira^c, Fábio Juliano Negrão^a, Marcio Eduardo de Barros^{a*}

^a *Faculdade Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados, MS, Brasil.*

^b *Faculdade Ciências Agrárias, Universidade Federal da Grande Dourados, MS, Brasil.*

° *Faculdade Ciências Biológicas e Ambiental, Universidade Federal da Grande Dourados, MS, Brasil.*

* *Contato do autor:* Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados/MS, 79825-070, MS, Brazil, Phone: +55 67 3410-2321, Fax: +55 67 3410-2327. *E-mail:* marciobarros@ufgd.edu.br

Abstract

Ethnopharmacological Relevance: The leaves of *Persea americana* Mill. (Lauraceae) are popularly used in the treatment of kidney disease in several countries in Central and South America This study aimed to evaluate the potential antilithiásico diuretic and the ethanol extract obtained from the leaves of *P. americana*.

Methods: The ethanol extract of *P. americana* (EEPA) was partitioned into semi-purified fractions FH, FCH, FAE and FHE. The acute toxicity of EEPA was evaluated with an oral dose of 2000 mg/kg body weight. In diuretic activity, doses of extract (125, 250 and 500 mg/kg) were administered orally, by gavage, in male Wistar rats, and urinary excretion was measured at time intervals up to 24 h controlled metabolic cage. The effect of antilithiasic EEPA and its fractions was performed by crystallization *in vitro* by addition of sodium oxalate in human

urine under constant stirring at 37°C, and the crystals formed were assessed by turbidimetry index and optical microscopy.

Results: In tests with phytochemicals EEPA met the abundant presence of flavonoids. There were evident signs of acute toxicity in animals treated with EEPA. In diuretic activity, the extract showed a significant increase in urinary volume excretion at doses of 250 mg/kg (4.9 mL/100 g/24 h, * $p < 0.05$) and 500 mg/kg (5.7 mL/100 g/24 h, ** $p < 0.01$) when compared to the control group (3.9 mL/100 g/24 h). There was also increased excretion of electrolytes, with 250 mg/kg (Na^+ 504 mmol/L e K^+ 427 mmol/L, * $p < 0.05$) and 500 mg/kg (Na^+ 582 mmol/L and K^+ 481 mmol/L, ** $p < 0.01$). In the test antilithiasic, EEPA induced an inhibitory effect on the crystallization of calcium oxalate, while the seven doses tested, five prevented the formation of crystals. The rate of turbidity significantly decreased from 1.9 (control) to 0.0 (2.5 mg), also a significant reduction (** $p < 0.01$) with the number of crystals in 77.7%.

Conclusions: The results indicate that EEPA no toxicity and has diuretic properties and antilithiasic. The activity can be attributed to the content of flavonoids reported by species.

Keywords: *Persea americana*, phytochemistry, diuretic activity, urolithiasis.

1. Introduction

Urinary tract diseases have become increasingly frequent and affecting a larger number of people. Its incidence may be associated in the accelerated rhythms of work, food and genetic factors. Urolithiasis is a complex process that results from a succession of several physico-chemical events including supersaturation, nucleation, growth, aggregation, and retention within renal tubules (Khan, 2012). It is important to point out that there is no satisfactory drug used in clinical therapy for treatment of urolithiasis requiring therefore a preventive treatment. Therefore, it is worthwhile to look for an alternative to these means by using medicinal plants or phytotherapy.

Persea americana Mill., (Lauraceae), popularly known as avocado or avocado pear, is a tree approximately 20 m, native to Central America, cultivated in several countries of tropical or subtropical climates around the world (Schultz, 1990). The leaves of this plant have been extensively used in traditional medicine for treatment of renal diseases (Agra *et al.*, 2007), high blood pressure, diabetes (Andrade-Cetto and Heinrich, 2005; Andrade-Cetto *et al.*, 2006), antipyretic and analgesic (Di Stasi *et al.*, 2002), diuretic, stomachic and bile duct (Balmé, 1978; Malik and Camm, 1995, De A Ribeiro, 1986, Ross, 1999). In addition to the traditional use of its leaves, the fruits are much sought after by humans and some animals as valuable foodstuff. Besides the oil, avocado fruit pulp contains carbohydrates and more protein than many other fruits, while its contents of vitamins A and B are high (Ross, 1999; Watt and Breyer-Brandwijk, 1962).

Previous phytochemical studies on *P. americana* showed the presence of heptadecanol derivatives, tannins, saponins (Owolabi *et al.*, 2005,

2007, 2010), steroids (Adeyemi *et al.*, 2002), triterpenoids glycosides (Adeboye *et al.*, 1999), coumarins and flavonoids (Lee *et al.*, 2012). Our preliminary studies on the pharmacological of *P. americana* showed that the extract of the leaves possesses vasorelaxant effect of the rat aortic ring and lower blood pressure (Owolabi *et al.*, 2005; Adeboye *et al.*, 1999), protective effect against hepatotoxicity induced by paracetamol (Adeyemi *et al.*, 2002), analgesic, anti-inflammatory and anticonvulsant property (Adeyemi *et al.*, 2002; Ojewole and Amabeoku, 2006), preventing or slowing down the progress of various oxidative stress-related disease (Owolabi *et al.*, 2010), hypoglycaemic (Antia *et al.*, 2005), anti-diabetic and possibly acts to regulate glucose uptake in liver and muscles by way of PKB/Akt activation, restoring the intracellular energy balance (Lima *et al.*, 2012) and for treatment of herpes simplex virus infections (Miranda *et al.*, 1997).

Although, *P. americana* is well recognized in Brazilian traditional medicine as having a renal and diuretic effect, no scientific data have been published supporting the claimed ethnomedical action. The aim of this study was evaluate the diuretic and antilithiasic potential of the ethanolic extract of *Persea americana* (EEPA), its semi-purified fractions (FH, FCH, FAE and FHE) the leaves.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

Persea americana Mill., Lauraceae, leaves were collected in March 2012 in Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil (22°14'S and 54°49'W.Gr). The plant was identified by Dr. Zefa Valdevina Pereira and a voucher specimen (DDMS 4880) was deposited at the of the Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, Brazil.

2.2. Extract preparation and fractionation

Air-dried leaves of *P. americana* (520 g) were exhaustively extracted by maceration with 95% ethanol at room temperature. The extract was filtered, concentrated under pressure in rotoevaporator at 45°C and lyophilized, afforded the ethanol extract (EEPA) (46 g). Part of this extract was dissolved in EtOH-H₂O 1:1 and partitioned with *n*-hexane, chloroform and ethyl acetate. The solvent was evaporated to give the hexane, chloroform, ethyl acetate and hydroethanol fractions. The ethanolic (EEPA) extract and fractions obtained were dissolved in distilled water with Tween 80 as vehicle just before administration.

2.3. Animals

Adults Wistar rats (± 250 g) supplied by the Biotery of the Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), Mato Grosso do Sul, Brazil. All animals were maintained under standard laboratory conditions, with a constant 12 h light/dark cycle and controlled temperatures ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) with free access to water and food. All procedures were approved by the protocol number 014/2012 by the Committee for Ethics and Animal Experimentation of the Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD).

2.4. Determination of total phenol content

The total phenolic content in the EEPA was determined using the Folin-Ciocalteu method (Meda *et al.*, 2005). Specifically, 100 μL of EEPA in methanol (1 g/L) was mixed with 1.0 mL of distilled water and 0.5 mL of Folin-Ciocalteu's (1:10 v/v) reagent. After 3 min, 1.5 mL of a saturated solution of Na_2CO_3 (2%) was added. After 30 min, the absorbance was measured at 765 nm using a spectrophotometer. The quantification was carried out using a standard curve of gallic acid prepared in 80% methanol, and the results are expressed in mg acid gallic/g of extract. The equation for the gallic acid curve was $y = 6.9848x + 0.0175$, with a correlation coefficient of $R = 0.991$. The ethanol solution was used as a blank. All of the assays were carried out in triplicate.

2.5. Determination of total flavonoids

To determine the level of flavonoids, 500 μL of EEPA was mixed with 1.50 mL of 95% ethanol, 0.10 mL of 10% aluminium chloride ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 0.10 mL of acetate sodium ($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) (1 M) and 2.80 mL of distilled water. The tubes were kept at room temperature for 40 min. The optical density was measured at 415 nm using a spectrophotometer. The same procedure was used for the analysis of the blank (Lin and Tang, 2007). To calculate the concentration of flavonoids, we prepared a calibration curve (2.5, 5.0, 10.0, 20.0, 25.0, 50.0, 100.0 and 125.0 μg) using quercetin as the standard. We then used these data to generate a linear regression model, and the line equation was obtained and used for the calculation of the experimental samples. The results are expressed in milligrams of quercetin equivalents per gram of extract. The equation of the quercetin curve was $y = 13.146x - 0.0021$, with a correlation coefficient of $R = 0.9953$. All of the assays were carried out in triplicate.

2.6. Condensed tannins (CT)

Condensed tannins concentrations were determined by a modified version of the method developed by Maxson and Rooney (1972). The EEPA of

were extracted in 10 mL of 1% HCl in methanol for 24 h at room temperature using mechanical shaking. The mixture was centrifuged for 5 min. 1 mL supernatant was mixed with 5 mL vanillin HCl reagent (8% concentrated HCl in methanol and 4% vanillin in methanol). The absorbance at 500 nm was read after 20 min. Catechin was used as the standard. Results were calculated as mg/g of EEPA.

2.7. Acute Toxicity

This assay followed the guidelines recommended by OECD 423 (Guidelines for Testing of Chemical, Acute Oral Toxicity, Guideline 423) (OECD, 2001). Female Wistar rats 8-12 weeks, were randomly allocated into two groups (n= 3/group) and fasted 12 hours before experiment. The control group received normal saline 1mL/kg by gavage, while the exposed group received 2000 mg/kg of the EEPA. The safety of 2000 mg / kg was later confirmed in three other animals as recommended in the OECD guideline.

The signs of toxicity in animals were observed by 2, 4, 6 and 24 hours and after that, once a day for 14 days. Toxic signs with general character were used as a criterion, with the following parameters: changes in body weight, feed and water intake, clinical signs (piloerection, twitches, tremors, convulsions, cyanosis, ataxia, diarrhea) and behavioral changes. The left kidney, lung, heart, spleen and liver were removed, weighed and examined grossly.

2.8. Diuretic activity

The diuretic activity was determined according to the method described by Kau *et al.* (1984), with some modifications. Male Wistar rats were divided into 6 groups (n = 5/group) and food fasted for 24 h. Each animal was placed individually in metabolic cages 6 hours before the experiment for environmental adaptation. After fasting, all animals received an oral dose of saline (0.9% NaCl) (5% of body weight) to impose an uniform load of water and salt (Benjumea *et al.*, 2005).

The drug furosemide (reference drug) was used dissolved in distilled water as positive control. The first group received 5 mL/kg of body weight of deionised water. The second group received 5 mL/kg of vehicle (deionised water and Tween) orally and was considered the control group. The third one received 5 mL/kg of body weight a furosemide dose of 10 mg/kg. The fourth, fifth and sixth group received 2 mL/kg of deionized water and 3 mL/kg of the extract at doses of 125, 250 and 500 mg/kg, respectively. Diuresis was monitored for 24 h and the cumulative urinary excretion was calculated in relation to body weight and expressed as mL/100 g of body weight.

2.8.1. Biochemical Analysis

Sodium and potassium electrolytes were estimated from each sample of urine from rats at the end of the experiment by the equipment Roche Electrolyte Analyzer 9180 and expressed as mmol/100 g of body weight. The diuretic and saluretic index, which have the function to show whether there was an increase in water and electrolytes excretion, were calculated by the following formulas: ID = group treated volume/control group volume, and IS = mmol/L treated group/mmol/L control group.

After 24 h mice were anesthetized with ketamine (100 mg/kg) and xylazine (20 mg/kg) and blood samples (3-5 mL) were collected into tubes containing ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA (1 mg/mL) by pricking the renal vein. Plasma was obtained by centrifugation at 4000 rpm for 10 min and frozen at -20 °C for analysis. Plasma levels of sodium and potassium were measured by an automatic analyzer (Roche, 9180 Electrolyte Analyzer).

2.9. Antilithiasic activity

Antilithiasic effect, crystallization of calcium oxalate (CaOx) in vitro (Robertson *et al.*, 1968) was obtained in isolated samples of human urine (6 volunteers, 3 ♂ and ♀ 3), which were centrifuged (8 min/5000 rpm), pH adjusted to 6.0, filtered and divided into two aliquots, one for control and the other for the extract testing (Atmani and Khan, 2000; Atmani *et al.*, 1996).

The precipitation of calcium oxalate was induced by the addition of 50 μ L of 0.1 M sodium oxalate per mL of urine every 15 min (0, 15, 30 and 45 min) under constant agitation at 37 °C. When used, *P. americana* was added 30 minutes the beginning of crystallization, it was filtered and used at a final concentration of 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2.5 and 5 mg of urine/mL based in a concentration-response curve (Balaji and Menon, 1997).

The CaOx crystals analysis was inferred by two methods: Turbidimetric: The formed crystals was semi-quantified by turbidity index (TI) of the solution by spectrophotometer (DO590), where were used aliquots of 100mL of each sample after crystallization in the presence or absence of extract (Hess *et al.*, 1995). The mean optical densities obtained in the urine without crystallization (white) and crystallization (test) of each sample was used to calculate the turbidity index (TI) by the formula: $TI = \frac{DO_t - DO_w}{DO_w}$ (Barros *et al.*, 2003). Optical microscopy: crystals were quantified and analyzed by size and shape in Neubauer chamber (Barros *et al.*, 2003; Dussol and Berland, 1998).

2.10. Statistical analysis

The data were expressed as the means \pm standard error of mean (SEM). Statistically significant differences were determined using analysis of variance (ANOVA), complemented by Newman-Keuls test or by Student's test, as appropriate. We adopted a significance level of $p < 0.05$.

3. Results

The phytochemical analysis of the lyophilized extract (EEPA) showed the presence of abundant flavonoids in the leaves of this plant (data not shown).

3.1. Analysis of acute toxicity

The oral (2000 mg/kg) administration of EEPA rats (female) did not produce mortality or any behavioral disorders, after observation for 14 days.

3.2. Diuretic activity

To evaluate the diuretic action of the EEPA and for furosemide, were analyzed urinary electrolyte (Na^+ and K^+) (mmol/L) contents and urinary volume (mL/100 g/24 h) (Table 1). The furosemide induced significant excretion values for water, 5.7 mL/100 g/24 h, for the excretion of Na^+ , 597 mmol/L and K^+ , 483 mmol/L, which was comparable to that of the control group (3.9 mL/100 g/24 h, Na^+ 392 mmol/L and K^+ 343 mmol/L) (Table 1).

Table 1 also shows that the oral administration of dose of 125 mg/Kg did not induce any important alteration in urinary excretion, nor the sodium and potassium excretion when compared to the control group. The orally treated with EEPA for the doses of 250 (4.9 mL/100 g/24 h, * $p < 0.05$) and 500 mg/Kg (5.7 mL/100 g/24 h, ** $p < 0.01$) increasing the urinary volume excretion at the times 4, 6 and 24 h compared with the control group (3.9 mL/100 g/24 h) (Table 1). However, for the dose of 500 mg/Kg diuretic index was similar of the groups the received furosemide, which significantly increased the urinary volume with a single dose at all times (** $p < 0.01$) (Table 1).

EEPA induced dose-dependent increased in sodium and potassium at 24 h at group treated with 250 mg/kg (Na^+ 504 mmol/L and K^+ 427 mmol/L, * $p < 0.05$) and 500 mg/kg (Na^+ 582 mmol/L and K^+ 481 mmol/L, ** $p < 0.01$) when compared to control group (Na^+ 392 mmol/L and K^+ 343 mmol/L). The furosemide increased the amount of electrolytes (Table 1).

3.3. Antilithiasic activity

Induction of CaOx crystallization in human urine resulted in characteristic CaOx crystals formation, and the presence of extract added to the urine before crystallization significantly modified the forming process of them, making the crystals smaller in size and number (Fig. 1).

The seven tested doses of EEPA the five bigger ones (0.250, 0.5, 1, 2.5, 5 mg) showed a significant decrease in the turbidity index (0.21, 0.12, 0.22, 0.0, 0.0, respectively, ** $p < 0.01$), when compared to control (1.9). The turbidimetry decreased with increasing extract concentration (Fig. 2A).

The used concentrations of EEPA were able to induce changes in the crystals number. Observation by light microscopy showed that all increasing doses of *P. americana*, significantly decreased the number of crystals formed in 77.7% in relation the control. The 0.0625 mg/mL dose showed the lowest significant effect compared with other doses (12.3%, * $p < 0.05$) (Fig. 2B).

All fractions decreased the turbidity index, the fraction FHE in 2.5 and 5 mg doses (0.4, * $p < 0.05$), and the fraction FAE at doses 2.5 and 5 mg (0.0, ** $p < 0.01$), decreased significantly when compared to control (1.9) (Fig. 3). The microscopy observation of crystals showed that all fractions significantly decreased the number of crystals (71.7%, ** $p < 0.01$) compared to control (Fig. 4).

3.4. Levels of phenols, flavonoids and tannins of the extract EEPA of *Persea americana*

After determination of the diuretic effect, we determined the levels of total phenols, flavonoids and tannins in the ethanolic extract. The EEPA had high levels of flavonoids and tannins with values of 563.19 mg/g and 120.81 mg/g,

respectively. The total phenolic content in the extract using the Folin-Ciocalteu method was of 5.61 mg/g EEPA.

4. Discussion and conclusion

The results of the present study show that no acute toxicity at the tested dose, as evidenced by the absence of animals mortality during 14 days, no macroscopic changes were detected in the animals entrails, nor significant changes of body weight and organ. Similar results were found in the acute and subacute toxicity study with oral administration of 10 g/kg of aqueous extract of *P. americana* (Ozolua *et al.*, 2009). Mohammad *et al.* (2010) showed the positive action of *P. americana* in the liver, where the methanolic extract showed a protective effect against toxicity and oxidative stress caused by acute intoxication by using paracetamol model.

The diuretic are drugs that increase urinary volume and sodium excretion, and are used to adjust the composition of body fluids in various pathological conditions including hypertension (Jackson *et al.*, 1996). Our study showed that EEPA (250 and 500 mg / kg) caused a significant increase in electrolytes urinary excretion (Na^+ and K^+) and water in comparison with the control group. The diuretic effect determined in *P. americana* can be attributed of the high content of flavonoids expressed in mg quercetina/g EEPA.

The flavonoids are a group of phenolic secondary plant metabolites that are widespread in nature and have a significant diuretic effect. Chemical studies of the leaves of *Persea americana* describe the isolation of flavonoids derivatives as apigenin, quercetin and quercitrin (Watt and Breyer-Brandwijk, 1962; Ross, 1999; Lima *et al.*, 2012). Authors have reported that these flavonoids demonstrated diuretic effect in several experimental models (Gasparotto Junior *et al.*, 2012; Novaes *et al.* 2012).

In the test to evaluate the antilithiasic activity, the doses 0.250 to 5 mg of EEPA significantly decreased the turbidimetry index and the number of crystals (Fig. 2A and 2B), a decrease of 72 and 77.7%, respectively (Fig 3). In studies that used the same crystallization in vitro technique, of Barros *et al.* (2003), Novaes *et al.* (2012) and Brancalion *et al.* (2012), observed an increase both in turbidity, and the number of crystals of smaller size. An inhibition of the size increase of the crystals potentially facilitates their disposal, which could contribute to antilithogenic effect of these plants (Barros *et al.*, 2003). However, our results showed that the extract and fractions of the *P. americana* prevent the crystals formation, naturally bioactive compounds that protect against the nucleation and / or development of crystals in the urine.

It is known the existence of multiple protein connections with oxalate in the kidneys (Selvam and Kalaiselvi, 2003). Atmani *et al.* (1996) points out that there is a matrix protein which proved to be selectively associated with calcium oxalate (CaOx) crystals it was identified as prothrombin fragment F1. It was concluded that the presence of 7-carboxyglutamic in the structure of prothrombin related proteins, which has a high affinity for Ca^{2+} , may be the key

to explain the association of this protein with CaOx crystals. Not only prothrombin, but also albumin and osteopontin are associated with the crystals formed in human urine. Osteopontin, which is a potent crystallization inhibitor was found in crystals matrix and kidney stones (Atmani *et al.*, 1996). It inhibits CaOx crystals nucleation, growth and aggregation (Thurgood *et al.*, 2008) and contains about 50% of residues of glutamic and aspartic acid, these amino acids may have a role in inhibiting the activity of urinary macromolecules.

Over the years, Tamm-Horsfall protein (PTH) has been described as a contributor to renal disease, and a natural defense against urinary tract bacterial infection. Moreover, PTH was known for its involvement in the crystallization and urinary stone formation. There is controversy about PTH, if it is a promoter or an inhibitor of calcium oxalate crystals aggregation. In in vitro urine concentrations of PTH inhibit the crystals aggregation, but increasing concentrations of calcium, sodium, PTH hydrogen ions progressively reduce its inhibitory activity (Jaggi, 2007). The leaves extract of *P. americana* has an effective role in urolithiasis and can participate in various stages of calculi growth, interfering in the crystals nucleation and reducing the number and size of them, as well as this proteins.

The ethyl acetate (FAE) and hydroethanol (FHE) fractions significantly decreasing the turbidimetry index and the number of crystals, with similar values of the EEPA). These results indicate that the main constituents of these fractions probably are the flavonoids. The fraction FH index decreased turbidity increased as the doses of the extract, like other fractions, however, other stabilizing their actions at the dose of 5 mg EEPA and continued to decrease

the rate FH (Fig. 3), requiring further studies with doses highest to prove this result. It is suggested that the mechanism of action and properties that affect the formation of calculus are the same as those of calcium oxalate formation of inhibitory proteins (Atmani *et al.*, 1996, Thurgood *et al.*, 2008; Jaggi 2007).

In conclusion, the results of the present study showed for the first time the diuretic and antilithiasic activity of *P. americana* showed significant effects on crystallization, and supports and extends the ethnomedicinal use for renal diseases and diuretic these plant. In additional, the effects caused by the EEPA, as well the semi-purified fractions, may be associated with the high levels of the flavonoids found in this plant. Studies are now underway to characterize the proteins present in the plant that could explain a potential for the for use in the treatment of renal or other disorders.

5. References

Legends to figures

Figure 1 - Photos of crystals analyzed by Neubauer chamber of the *in vitro* induction of CaOx crystallization in normal human urine, adding sodium oxalate in the absence and presence of increasing amounts of *P. americana* with different concentrations (0.0625, 0.125, 0.250, 0.5, 1, 2.5 and 5 mg/L).

Figure 2 – A - The induction of CaOx crystallization measured by turbidimetry index, B- number of crystals analyzed by counting Neubauer chamber, in

normal human urine by adding sodium oxalate in the absence and presence of increasing amounts of *P. americana* with different concentrations (0.0625, 0.125, 0.250, 0.5, 1, 2.5 and 5 mg/L).

Figure 3 – The induction of CaOx crystallization measured by turbidimetry index in normal human urine by adding sodium oxalate in the absence and presence of the hexane (FH), chloroform (FCH), ethyl acetate (FAE) and hydroethanol (FHE) fractions of *P. americana* with different concentrations (0.5, 1, 2,5 e 5 mg/L).

Figure 4 – The induction of CaOx crystallization measured by number of crystals analyzed by counting Neubauer chamber in normal human urine by adding sodium oxalate in the absence and presence of the hexane (FH), chloroform (FCH), ethyl acetate (FAE) and hydroethanol (FHE) fractions of *P. americana* with different concentrations (0.5, 1, 2,5 e 5 mg/L).

Table 1 – Effect of single oral administration with *P. americana* on urinary volume and electrolyte excretion.

Treatment	Dose (mg/kg)	Urine volume (mL/100 g/24 h)	Diuretic index ¹	Na ⁺ (mmol/L/100 g/24 h)	K ⁺ (mmol/L/100 g/24 h)	Saluretic index ²	
						Na ⁺	K ⁺
Control	-	3.9 ± 0.1	-	392 ± 15.2	343 ± 23.4	-	-
Furosemide	10	5.7 ± 0.2 **	1.4	597 ± 17.8 **	483 ± 53.5 **	1.5	1.4
EEPA	125	3.7 ± 0.3	0.9	501 ± 23.2	423 ± 24.3	1.2	1.2
EEPA	250	4.9 ± 0.1 *	1.2	504 ± 17.6 *	427 ± 27.3 *	1.2	1.2
EEPA	500	5.7 ± 0.1 **	1.4	582 ± 49.0 **	481 ± 71.5 **	1.4	1.4

Data are expressed as mean \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ in comparison with the control group (vehicle) using One-Way variance test (ANOVA) following by Student-Newman-Keuls test.

¹ Diuretic index = volume treated group/volume control group.

² Saluretic index = mmol/L treated group/mmol/L control group.

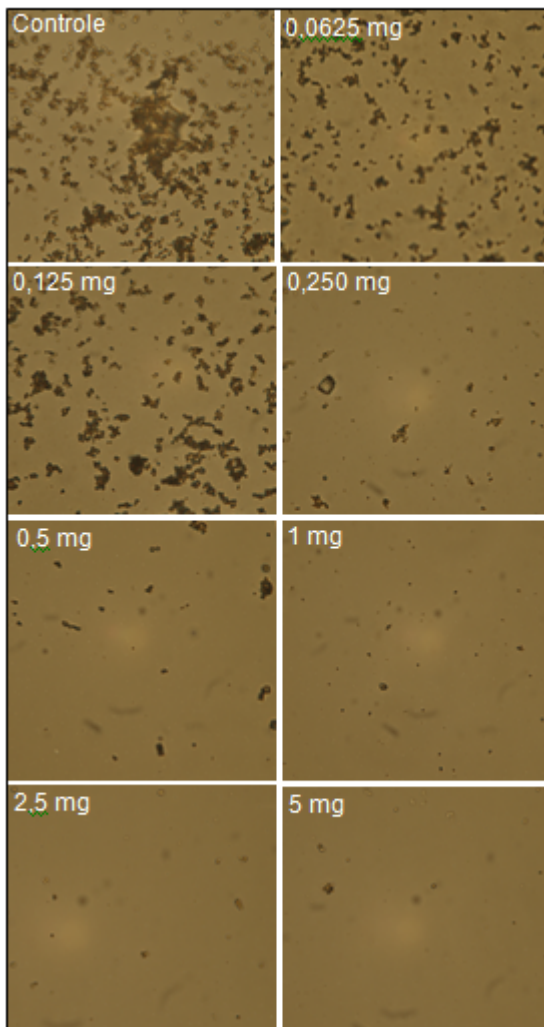


Fig.1 – Crystals of Neubauer chamber.

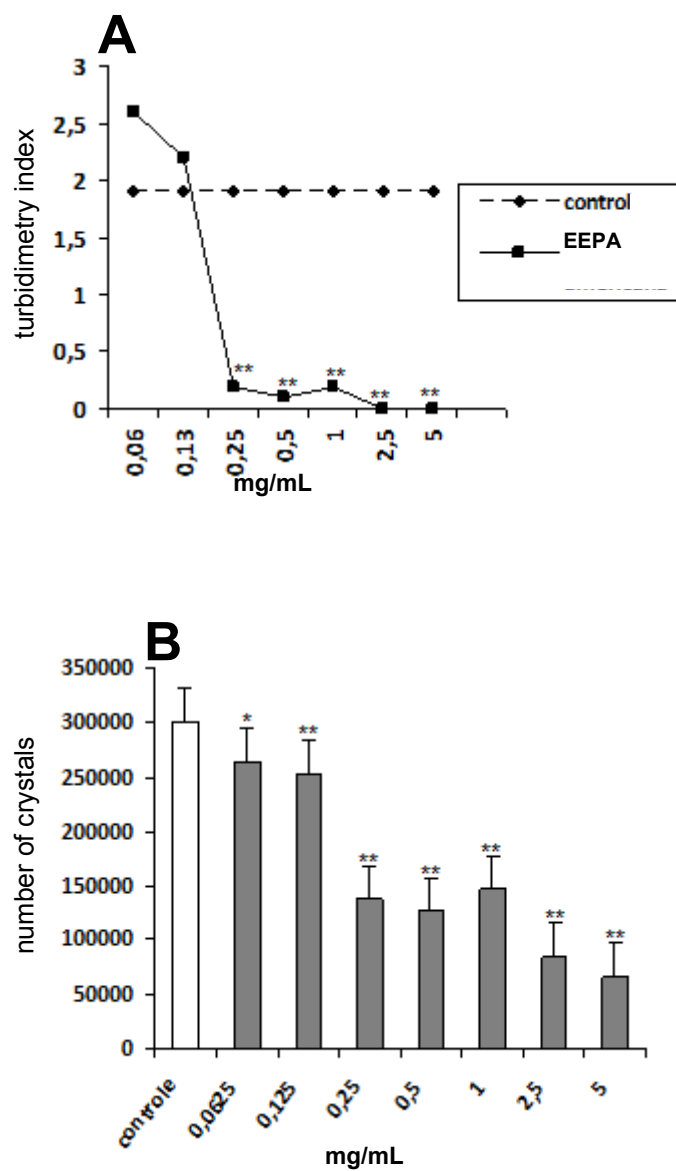


Fig.2 –Turbidimetry index and number of crystals.

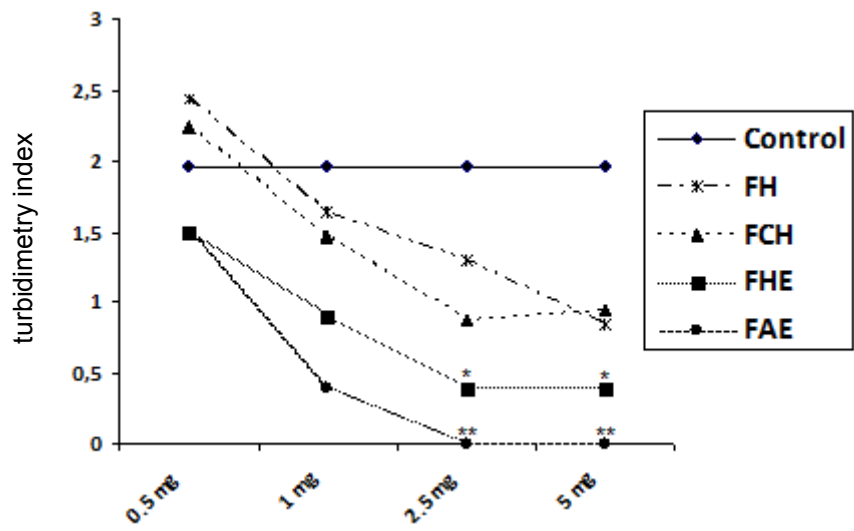


Fig.3 – Turbidimetry index of fractions.

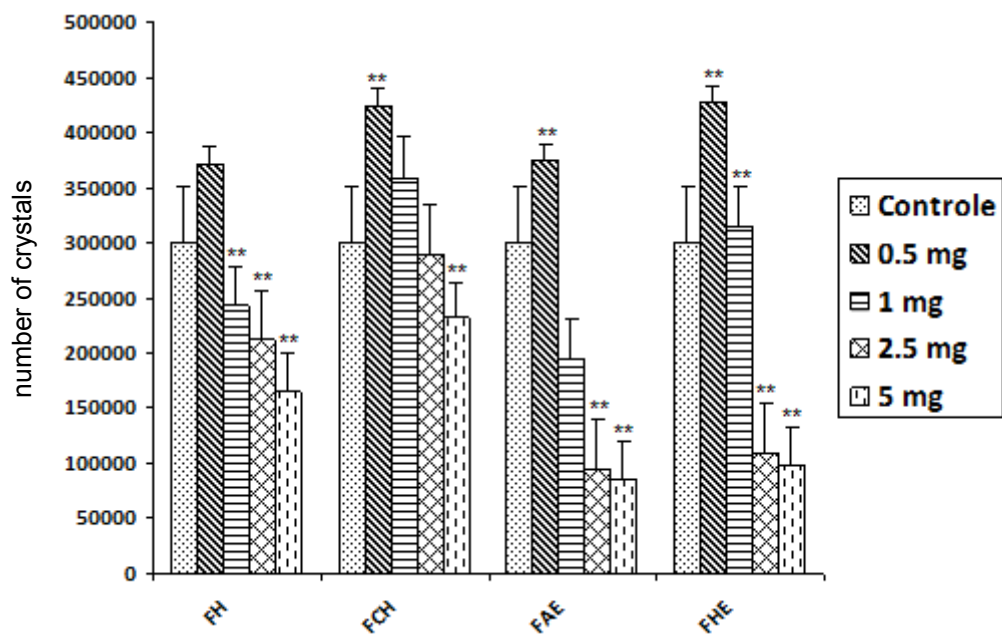


Fig.4 – Number of crystals of fractions.